ФЕРМЕНТЫ

В ОТО-
РИНО-
ЛАРИНГОЛОГИИ

ФЕРМЕНТЫ В ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ

•

Под редакцией докт. биол. наук
проф. К. Н. ВЕРЕМЕЕНКО

КИЕВ «ЗДОРОВ'Я» 1980

ББК 56.8
617.6
Ф43

УДК 616.21+615.355

Коллектив авторов:

К. Н. Веремеенко, А. И. Цыганов, В. А. Гукович, Л. И. Волохонская, О. П. Голобородько, А. И. Кизим, В. М. Лосицкая, Г. А. Опанащенко.

Ферменты в оториноларингологии. Под. ред. проф. К. Н. Веремеенко.— Киев: Здоров'я.— 1980, 184 с.

Титульный редактор — Веремеенко К. Н.— доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии Киевского научно-исследовательского института отоларингологии МЗ УССР.

В монографии обобщены данные литературы и собственных исследований авторов по использованию ферментов с диагностической и лечебной целью в ЛОРклинике. Освещено значение энзимодиагностики в ЛОРонкологии, рассматривается роль нарушения ферментативных процессов в патогенезе тонзиллитов, аллергических заболеваний верхних дыхательных путей и других поражений ЛОРорганов. Представлены сведения о лечебных свойствах ферментов, обосновано их применение, даны конкретные рекомендации использования ферментных препаратов при гнойно-воспалительных заболеваниях и злокачественных новообразованиях. Изложены материалы о применении ингибиторов протеолиза при фибринолитических кровотечениях, наблюдаемых в ЛОРклинике, и аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей. Описаны методы определения активности ряда ферментов в биологических жидкостях и тканях. Приведены рецептурные прописи ферментных и антиферментных препаратов.

Монография рассчитана на отоларингологов, хирургов, ортопедов, терапевтов, физиотерапевтов, стоматологов, офтальмологов, врачей-лаборантов.

Ил. 18. Табл. 34. Список лит.: с. 173—182.

Рецензенты: докт. мед. наук Н. П. БЕЛКИНА,
канд. мед. наук Э. Г. ГОРОЖАНСКАЯ,
канд. мед. наук В. В. ТИТИЕВСКАЯ

Ф $\frac{51600-029}{М209(04)-80}$ 15.80. 4121000000

СВЕТЛОЙ ПАМЯТИ
ОСНОВАТЕЛЯ КИЕВСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ОТОЛАРИНГОЛОГИИ,
ЛАУРЕАТА ЛЕНИНСКОЙ ПРЕМИИ,
ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА АН УССР,
ПРОФЕССОРА
АЛЕКСЕЯ ИСИДОРОВИЧА КОЛОМИЙЧЕНКО
ПОСВЯЩАЕТСЯ

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы в литературе накопилось большое количество данных, свидетельствующих о важной роли исследований ферментов в диагностике, патогенезе и лечении различных заболеваний. По образному выражению Абдергальдена (1958), мы находимся сегодня в начале новой эры развития медицины — эры, стоящей под знаком ферментов.

Большой интерес к изучению ферментов объясняется, прежде всего, их кардинальной ролью в жизнедеятельности организма. Ферменты составляют основную массу живого вещества. Именно действием ферментных белков обусловливается совокупность химических превращений, составляющих обмен веществ. Все биологические функции организма — активные движения, рост, размножение, пищеварение, дыхание, синтез и распад различных соединений, обезвреживание продуктов обмена и выведение их из организма — осуществляются координированным и направленным действием множества ферментных систем.

Гормоны, витамины, микроэлементы, метаболиты и другие биологически активные соединения теснейшим образом связаны с функцией ферментов; большинство из них проявляют свое действие через ферментные системы. Например, ряд витаминов группы В входит в состав простетической группы ферментов; микроэлементы являются активаторами либо непосредственными составными частями молекулы фермента. Гормоны проявляют свою биологическую активность также во многих случаях путем воздействия на ферментные системы, т. е. посредством ферментов. Поэтому указанные биологически активные соединения необходимо изучать не изолированно, а в связи с их влиянием на активность соответствующих ферментных систем.

Внедрение ферментологии в медицинскую практику стало возможным благодаря успехам общей энзимологии. В настоящее время известно свыше 2000 ферментов, которые по химической

природе являются простыми или сложными белками. Расшифрована структура многих ферментов, а также специфических участков в их молекуле — активных центров, которые осуществляют акт биокатализа. В 1969 г. произведен в лабораторных условиях синтез первого фермента — рибонуклеазы, свершилось гениальное предвидение И. П. Павлова, который писал: «И если не я, то вы, наверное, дождетесь того времени, когда природа их будет разъяснена, и они будут получаться искусственно, подобно другим телам»[1].

Большие успехи достигнуты в разработке методов получения ферментов в высокоочищенном состоянии, что дало возможность наладить промышленное производство препаратов ферментов, пригодных для медицинских целей. Разработаны простые и высокочувствительные приемы определения активности ферментов в биологических жидкостях — крови, моче, ликворе, слюне, экссудатах. Они легли в основу ряда ценных методов лабораторной диагностики многих заболеваний. Препараты очищенных ферментов используются также в качестве специфических реактивов для обнаружения и количественного определения активных соединений в тканях и жидкостях организма человека. Необходимо отметить высокую чувствительность и специфичность методов химического анализа с помощью ферментов.

В настоящее время оформилась новая область теоретической и практической медицины — медицинская энзимология. Она включает следующие разделы:

а) энзимодиагностику — исследование ферментов в биологических жидкостях и тканях с диагностической целью, а также для суждения о течении патологического процесса и эффективности применяемой терапии;

б) энзимотерапию — применение ферментов, их активаторов и ингибиторов с лечебными целями;

в) использование ферментов для изучения патогенеза ряда заболеваний.

Энзимологические тесты нашли широкое применение в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний, гастроэнтерологии, онкологии, акушерстве и гинекологии, офтальмологии, стоматологии. Накоплен положительный опыт применения ферментов, коферментов, ингибиторов ферментов с терапевтической целью.

В оториноларингологической клинике энзимологические исследования, особенно с диагностической целью, не получили еще должного развития.

---

[1] Павлов И. П. Полное собрание сочинений. М., Изд-во АН СССР, 1952, т. 5, с. 19.

В Киевском НИИ отоларингологии с 1961 г. началось целенаправленное и систематическое изучение ферментов и изоферментов для диагностики и терапии ЛОРзаболеваний. В биохимической лаборатории института впервые получены кристаллические препараты протеолитических ферментов для медицинских целей, изучены их лечебные свойства, что послужило основанием для широкого применения этих веществ в отоларингологии и других областях медицины.

Цель настоящей монографии — суммировать собственные материалы и данные литературы, а также дать практические рекомендации врачам по диагностическому и лечебному применению ферментов в оториноларингологии. В отечественной и зарубежной литературе отсутствуют такие работы. В предлагаемой книге авторы делают попытку в какой-то мере восполнить этот пробел. В монографии ввиду ее практической направленности очень кратко рассмотрены некоторые вопросы биохимии ферментов. Читателей, желающих получить более детальную информацию по теоретическим вопросам ферментологии, мы отсылаем к монографиям: И. И. Иванов, Б. Ф. Коровкин, И. М. Маркелов «Введение в клиническую энзимологию» (1974); «Клиническая ферментология» под редакцией Щеклика (1966); Мосс, Баттерворт «Энзимология и медицина» (1978).

Авторы будут считать свою цель достигнутой, если книга привлечет внимание врачей к этому перспективному направлению медицины.

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АМЦГК — 4-амино-метилциклогексанкарбоновая кислота
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
БА — бензоил-Д*L*-аргинин
БАПНА — N-бензоил-Д*L*-аргинин-пара-нитроанилид
БАЭЭ — N-бензоил-Д*L*-аргининэтиловый эфир
ГЛ — гиппурил-*L*-лизин
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК-аза — дезоксирибонуклеаза
ЕА — единицы активности
ИЭТ — изоэлектрическая точка
КФ — кислая фосфатаза
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
МАО — моноаминооксидаза
МДГ — малатдегидрогеназа
НАД — никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма
НАДН·Н+ — никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма
ПАМБК — парааминобензойная кислота
ПРА — протаминрасщепляющая активность
ПРФ — продукты распада фибриногена
РНК — рибонуклеиновая кислота
РНК-аза — рибонуклеаза
СДГ — сукцинатдегидрогеназа
СИТ — соевый ингибитор трипсина
ТАМЭ — N-тозил-*L*-аргининметиловый эфир
ТХУ — трихлоруксусная кислота
ФХ — фактор Хагемана
ЦО — цитохромоксидаза
ЩФ — щелочная фосфатаза
ЭДТА — этилен-диамин-тетраацетат
α_1-АТ — α_1-антитрипсин
α_2-МГ — α_2-макроглобулин
ε-АКК — ε-аминокапроновая кислота

ФЕРМЕНТЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ПАТОГЕНЕЗЕ ЛОРЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время установлено, что в основе любой болезни лежит нарушение координированного действия многочисленных ферментных систем. Поэтому понятно внимание, проявляемое клиницистами различных специальностей к методам энзимодиагностики. Сейчас эта область знаний интенсивно развивается, и более 25% методов исследования, используемых в клинико-диагностических лабораториях, приходится на энзимологические, а в будущем предполагается, что этот процент возрастет до 50 (Данев, 1973).

Современный этап характеризуется исследованиями в биологических жидкостях и тканях организма не только суммарной активности ферментов, но и их отдельных изоферментных форм. Изоферментами называются те множественные формы ферментов, которые образуются вследствие генетически обусловленных различий в первичной структуре белка. Они имеют одинаковую субстратную специфичность, но отличаются по физико-химическим свойствам: электрофоретической подвижности, чувствительности к температуре, pH среды, ингибиторам, активаторам и др. Обнаружение различного количественного соотношения изоферментов в отдельных тканях повысило специфичность энзимодиагностики (Уилкинсон, 1968). Оказалось, что заболевание того или иного органа, имеющего определенный изоферментный спектр, сопровождается появлением специфических для него изоферментов в сыворотке крови, в связи с чем изоферментный состав последней приближается к изоферментному спектру поврежденной ткани. Известно, что более 100 ферментов существуют в различных изоферментных формах. Широкое клиническое применение нашли изоферментные формы дегидрогеназ, фосфатаз, трансфераз и др.

Наибольший интерес для клиники представляет изучение в сыворотке крови ферментов и их изоформ, которые имеют различный источник происхождения и постоянны в норме. Ферменты сыворотки крови по происхождению можно условно разделить на а) генуинные (секреторные) — синтезируемые в различных

органах в норме и выделяемые в кровь, где они выполняют определенные физиологические функции (ферменты системы свертывания крови, фибринолиза, образования и распада кининов) и б) индикаторные, которые участвуют во внутриклеточном обмене, в норме содержатся в сыворотке крови в незначительных количествах, при поражении тех или иных органов проникают в кровь, где их активность возрастает. Кроме того, большое значение имеет исследование ферментов в моче, слюне, спинномозговой жидкости, экссудатах.

В последнее время диагностическое значение приобретает исследование ферментов в биоптатах тканей. Широкое распространение нашло исследование ферментов аминокислотного обмена, в частности аминотрансфераз, углеводного обмена ферментов, участвующих в свертывании крови, фибринолизе и др.

Нарушение количественного соотношения различных ферментов или их изоферментных форм в биологических жидкостях может выражаться в повышении активности фермента по сравнению с ее величиной в норме, снижении ферментативной активности и появлении ферментов, которые в норме не обнаруживаются.

Активность ферментов в сыворотке крови повышается при поражениях органов и тканей, связанных с увеличением проницаемости клеточных мембран или нарушением внутриклеточной организации ферментов (гиперферментемия). Такое нарастание активности может быть обусловлено более высоким количественным их содержанием в тканях, т. е. наличием определенного градиента концентрации ферментов. Например, активность аспартат-аминотрансферазы в ткани печени примерно в 10 000 раз выше, чем в сыворотке крови. Наблюдается корреляция между степенью повреждения органа и увеличением активности сывороточных ферментов.

Механизм повышения активности ферментов в сыворотке при патологических состояниях неясен и ни одна из предложенных гипотез (И. И. Иванов и соавт., 1974) не может полностью объяснить это явление. В числе различных причин гиперферментемии в сыворотке крови необходимо учитывать возникновение при патологии новых условий среды, в частности изменение соотношения активаторов и ингибиторов ферментов. Поэтому комплексное изучение ферментов и факторов, регулирующих их активность, даст более полную информацию о сдвигах в ферментных системах в условиях патологии.

Снижение активности ферментов наблюдается при нарушении функции органов, синтезирующих их, или при ряде наследственных энзимопатий.

Наиболее интенсивно вопросы энзимодиагностики разрабатываются при заболеваниях печени, сердца, поджелудочной железы, злокачественных новообразованиях.

В практике отоларингологии определение активности ряда ферментов нашло применение в диагностике раковых поражений, тонзиллитов, аллергических заболеваний и некоторой другой патологии ЛОРорганов.

ЗНАЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЛОРОРГАНОВ

Опухолевый рост, как известно, сопровождается нарушением координированной деятельности ферментных систем, которое оказывает влияние на весь организм (В. С. Шапот, 1975). При этом некоторые высокочувствительные ткани, отдаленные от опухоли, изменяются аналогично тканям, пораженным бластоматозным ростом. В связи с этим изучение ферментного аппарата как в самой опухоли, так и в тканях, отдаленных от нее, представляет несомненный интерес. В литературе уже имеется большое количество сведений об изменениях ряда ферментных систем при злокачественных новообразованиях различных локализаций. Ниже систематизированы материалы, накопленные почти за 20 лет в Киевском научно-исследовательском институте отоларингологии им. профессора А. И. Коломийченко, а также данные других ЛОРонкологических клиник в нашей стране и за рубежом по изучению биохимических и гистохимических признаков малигнизации тканей ЛОРорганов. Основная цель, преследуемая нами,— рассмотреть значение этих исследований в диагностике, патогенезе, характеристике степени агрессивности рака, возникающего в области горла, носа и уха.

Ферменты обмена углеводов

В связи с тем что большинство исследователей считают нарушение равновесия между гликолизом и дыханием ткани в процессе озлокачествления клеток одним из важных признаков малигнизации, мы, прежде всего, остановимся на наблюдаемых у больных ЛОРзаболеваниями сдвигах в активности гликолитических ферментов.

Одной из наиболее важных биохимических особенностей клеток злокачественных опухолей считается высокий уровень процессов гликолиза. Большинство раковых опухолей характе-

ризуется редко наблюдаемым в нормальных тканях аэробным гликолизом, т. е. в условиях даже достаточного снабжения ткани кислородом основная часть глюкозы превращается в молочную кислоту, а не окисляется в трикарбоновом цикле до углекислого газа и воды. Следствием аэробного гликолиза является неэкономное использование энергии в тканях злокачественных новообразований: так, при гликолитическом расщеплении 1 молекулы глюкозы образуется всего 2 молекулы АТФ, а в условиях дыхания — 36 молекул. Повышение интенсивности гликолиза в раковых опухолях привлекло внимание к изучению основных ферментов, катализирующих этот процесс: гексокиназы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), альдолазы и др. Исследование активности ряда ферментов гликолиза в крови и тканях опухолей больных злокачественными новообразованиями ЛОРорганов позволило выявить определенные изменения интенсивности гликолитических процессов, которые можно использовать при данных заболеваниях как объективный диагностический критерий.

Одним из ферментов гликолиза, определение активности которого в крови больных ЛОРонкологическими заболеваниями может иметь диагностическое значение, является гексокиназа (АТФ: D-гексоза-6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1.). Этот фермент катализирует первую реакцию многоступенчатого гликолитического превращения углеводов — фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфорной кислоты за счет концевой фосфатной группы АТФ. Определение активности гексокиназы в сыворотке крови при онкологических заболеваниях с диагностической целью началось после установления С. А. Нейфахом и Н. М. Монаховым (1967) факта отсутствия активности этого фермента в крови здоровых людей и появления ее при наличии в организме злокачественной опухоли.

У больных злокачественными новообразованиями ЛОРорганов активность сывороточной гексокиназы определяется в 84—87% случаев (К. П. Маркова, В. В. Михайлов, 1971; К. Н. Веремеенко и соавт., 1972). Однако данные, полученные при сопоставлении активности фермента со степенью выраженности опухолевого процесса, противоречивы. Так, К. П. Маркова и В. В. Михайлов (1971) выявили почти двукратное увеличение активности фермента в сыворотке крови больных со II и III стадиями рака ЛОРорганов по сравнению с величинами активности гексокиназы при I стадии заболевания. В то же время, согласно данным К. Н. Веремеенко и соавторов (1972), при I и II стадиях рака гортани положительная гексокиназная проба обнаруживалась во всех случаях и была более высокой, чем при III стадии заболевания.

При изучении активности гексокиназы в сыворотке крови больных раком гортани установлеиа также определеиная закономерность, позволяющая судить о характере течения заболевания в ходе терапии: больные раком гортани I и II стадии с высокими значениями активности сывороточной гексокиназы (40 МЕ и более) плохо поддаются лечению (К. Н. Веремеенко и соавт., 1972).

Таким образом, определение активиости гексокииазы в сыворотке крови у лиц со злокачественными новообразованиями ЛОРоргаиов можио примеиять как дополнительный диагностический тест, а также как прогностический — с целью установления характера течеиия ракового процесса.

Несколько снижает диагностическую ценность этого биохимического показателя выявлеиие гексокиназной активности в сыворотке крови у части больных с различиыми доброкачествеииыми опухолями ЛОРоргаиов, а также при хроническом ларингите (К. П. Маркова, В. В. Михайлов, 1971; К. Н. Веремеенко и соавт., 1972).

Важным ферментом гликолиза, исследование которого при раке гортани имеет диагностическое значение, является ЛДГ (L-лактат:НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27). Оиа катализирует последиюю реакцию гликолитического расщепления углеводов — обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную.

А. И. Цыганов и соавторы (1978) изучили распределение активиости ЛДГ в различных клеточных структурах опухоли и окружающих ее тканей (операционный материал). Активиость ЛДГ обнаруживалась во всех исследуемых клеточных фракциях (табл. 1. В макроскопически неизмененной слизистой оболочке гортани, служащей относительиым контролем, самая высокая активиость наблюдалась в растворимой фракции. Оиа была в 3 раза выше активиости ЛДГ в митохоидриальной и надмитохондриальной фракциях. В ткани раковой опухоли гортаии активиость фермента повышалась, что особенио выражено для растворимой фракции. Показатели активиости ЛДГ в этой фракции в 3,5 раза выше соответствующих даиных для относительного контроля. Увеличение ферментативной активности в митохондриях и надмитохондриальной фракции было менее интенсивным: соответственио в 1,6 и 2,5 раза.

Если сравнить активность ЛДГ в опухоли, пограничной с ней ткани и макроскопически неизмененной слизистой оболочке, можно отметить, что в надмитохоидриальной и растворимой фракциях постепенно уменьшается активиость фермента по мере удаления исследуемой ткани от опухоли. Активиость митохон-

Таблица 1. *Активность ЛДГ в клеточных фракциях ткани гортани при ее злокачественном поражении ($M \pm m$, мкмоль субстрата) (мин·мг белка)*

Фракция	Исследуемая ткань гортани		
	Макроскопически неизмененная слизистая оболочка	Пограничная с опухолью ткань	Опухолевая ткань
Митохондриальная (600—10 000g)	0,12±0,011	0,19±0,023 P<0,05	0,19±0,021 P<0,02
Надмитохондриальная (10 000—105 000g)	0,12±0,020	0,20±0,032 P>0,05	0,30±0,056 P<0,01
Растворимая (после 105 000g)	0,38±0,030	0,96±0,100 P<0,001	1,33±0,090 P<0,001

Примечание. P — достоверность различия по сравнению с данными для макроскопически неизмененной слизистой оболочки.

дриальной ЛДГ в пограничной с опухолью ткани и самой опухоли одинакова (см. табл. 1).

Мы изучали также активность фермента в биоптическом материале злокачественных опухолей различных стадий, доброкачественных опухолей, твердых папиллом и при хроническом ларингите (О. П. Голобородько, Г. А. Опанащенко, 1976). Результаты этих исследований суммированы в табл. 2. При всех исследованных стадиях рака гортани активность ЛДГ значительно повышается по сравнению с активностью макроскопически неизмененной слизистой оболочки. Увеличение активности выражено в одинаковой мере (в среднем в 2,6 раза) при начальных (II), более поздних (III) и запущенных (III—IV) стадиях опухолевого процесса. В ткани доброкачественных опухолей (фибромы, полипы) активность ЛДГ существенно не отличалась от активности фермента в макроскопически неизмененной слизистой оболочке, причем ни в одном случае активность фермента в доброкачественных опухолях и слизистой оболочке не достигала такой, которая выявлялась в тканях злокачественных новообразований.

В ткани твердых папиллом гортани активность ЛДГ повышалась по сравнению с данными контрольной группы более значительно (примерно в 4 раза), чем в ткани раковых опухолей.

В ткани гортани при хроническом ларингите активность фермента также возрастает, но в меньшей степени, чем в ткани раковых опухолей и твердых папиллом.

Таким образом, злокачественные новообразования гортани характеризуются значительным увеличением активности ЛДГ

Таблица 2. *Активность ЛДГ в тканях гортани при ее различных поражениях*

Диагноз	Активность ЛДГ, мкмоль субстрата/(мин·мг белка)		
	M±m	Пределы колебаний	P
Рак гортани			
II стадия	1,49±0,16	1,10—2,11	<0,001
III »	1,45±0,14	1,00—2,28	<0,001
III—IV »	1,47±0,21	1,05—1,72	<0,001
Доброкачественные опухоли	0,46±0,042	0,26—0,77	>0,05
Твердые папилломы	2,29	2,12—2,46	
Хронический ларингит	0,72±0,061	0,62—0,82	<0,05
Макроскопически неизмененная слизистая оболочка	0,56±0,035	0,31—0,79	

Примечание. Р вычислено по сравнению с данными для макроскопически неизмененной слизистой оболочки.

по сравнению с данными для макроскопически неизмененной слизистой оболочки. Особенно важно то, что активность ЛДГ повышается уже при начальных стадиях рака гортани, т. е. количественное биохимическое определение активности ЛДГ в биоптическом материале является чувствительным методом, позволяющим диагностировать раковые опухоли на ранних стадиях заболевания. Определение активности ЛДГ можно использовать не только для установления малигнизации, но и для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей гортани.

Практическая ценность метода определения активности ЛДГ в биоптатах различных опухолей гортани с диагностической целью заключается в том, что окончательный результат может быть получен через короткое время после взятия кусочка опухоли, а количество ткани, необходимое для исследования, может составлять 30—50 мг. Подробное описание методов получения исследуемого материала и определения активности фермента будет приведено дальше.

Значительно повышенную активность ЛДГ (примерно в 2 раза) наблюдали также Fujisaki и соавторы (1972) в раковых

опухолях гайморовых пазух по сравнению с окружающими опухоль тканями или со слизистыми оболочками верхнечелюстных пазух при хронических синуситах.

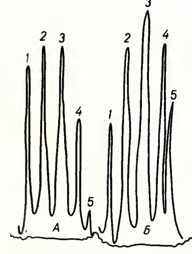


Рис. 1. Денситограммы изоферментов ЛДГ растворимой фракции из макроскопически неизмененной слизистой оболочки *(А)* и ткани злокачественной опухоли гортани *(Б)*. Данные типичного опыта: *1* — $ЛДГ_1$, *2* — $ЛДГ_2$, *3* — $ЛДГ_3$, *4* — $ЛДГ_4$, *5* — $ЛДГ_5$

Нами изучен также изоферментный спектр ЛДГ тканей гортани. Для этих исследований использован метод диск-электрофореза в полиакриламидном геле. По сравнению с макроскопически неизмененной слизистой оболочкой в растворимой фракции из ткани раковых опухолей гортани увеличивалось содержание малоподвижных форм $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ (рис. 1).

Изменялся изоферментный спектр ЛДГ также в раковых опухолях верхнечелюстных пазух (Fujisaki и соавт., 1972). Для тканей злокачественных новообразований этой локализации было характерно преобладание фракций $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$, а в слизистых оболочках верхнечелюстных полостей при хронических синуситах превалировала $ЛДГ_3$, на основании чего авторы разграничили раковый и воспалительный типы изоферментных спектров ЛДГ.

А. К. Борджадзе (1973) обнаружил определенные сдвиги активности ЛДГ в ткани различных опухолей гортани гистохимическими исследованиями: активность фермента резко повышалась в раковых опухолях, меньше — в папилломах с атипическим ростом эпителия и совсем мало — в папилломах без выраженного атипического роста эпителия и полипах гортани (в данной работе отсутствует количественная оценка наблюдений). Повышенная активность ЛДГ гистохимическими методами исследования выявлена также и в злокачественных опухолях полости носа по сравнению с непораженной слизистой оболочкой (Ishii, 1972).

Лучевая терапия оказывает угнетающее действие на лактатдегидрогеназную активность тканей злокачественных опухолей гортани (А. К. Борджадзе, 1973; А. Ф. Карась, 1974).

В ряде работ изучалась общая активность ЛДГ и в сыворот-

ке кровн больных раком гортанн (А. А. Сквнрская н соавт., 1973; К. Н. Веремеенко и соавт., 1976). Согласно полученным результатам, активность сывороточного фермента прн раке гортани значнтельных нзмененнй не претерпевает. Не обнаружено изменений общей актнвностн ЛДГ и в сыворотке кровн больных злокачественными опухолями носа (Ishii, 1972). В то же время А. А. Сквнрская н соавторы (1977) отметнлн значнтельные изменения нзоферментного состава ЛДГ в сыворотке кровн больных раком гортанн: интенснвно увеличивалась актнвность катодных фракций $ЛДГ_4$ н $ЛДГ_5$ н снижалась актнвность анодных фракций $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$. Изоферментный состав сывороточной ЛДГ исследован также у 2 больных раком гортанн А. М. Голубевым и соавторами (1973), однако вследствие огранненного колнчества материала сделать выводы авторам не представилось возможным. Tanaka и соавторы (1976) выявилн в сыворотке кровн больных раком гортани, который сопровождался гнпертиреозом, необычный изофермент ЛДГ в внде добавочной полосы между $ЛДГ_1$ н $ЛДГ_2$. После специальных нсследований авторы склоняются к мыслн, что он пронсходит из раковой тканн, хотя и не исключают возможной его связн с тиреотокснческим состоянием.

Исходя из того что глнколиз является основным процессом в продукцнн энергнн в эрнтроцитах, в этнх клетках прн заболевании раком гортанн также нсследовали актнвность ЛДГ.

А. А. Сквнрская н соавторы (1973) установнлн, что эритроциты больных злокачественнымн новообразованнями гортани проявляют почтн вдвое большую активность фермента, чем красные клетки крови доноров. Прн этом заболеванни изменяется и изоферментный спектр ЛДГ эрнтроцитов: повышается содержание $ЛДГ_{3-4}$ н $ЛДГ_5$ н уменьшается уровень $ЛДГ_{1-2}$ (А. А. Сквирская н соавт., 1977). Полученные результаты позволили этнм авторам сделать вывод о том, что, по-видимому, у больных раком гортани наблюдается гнпоксня, н предложить нспользовать данный показатель при оценке общего состояния больного.

При злокачественных новообразованиях ЛОРорганов в сыворотке кровн н ее форменных элементах нсследовали также актнвность ряда другнх ферментов гликолнза. В эрнтроцитах больных раком гортанн В. М. Лосицкая (1966) обнаружила некоторое возрастание актнвности фосфофруктокнназы (АТФ: D-фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.11), а А. А. Сквирская н соавторы (1973) — фосфогексоизомеразы (D-глюкозо-6-фосфат-кетол-нзомераза, КФ 5.3.1.9). Незначнтельно повышалась активность фосфогексоизомеразы н в сыворотке крови (А. А. Сквнрская н соавт., 1973). Прн изученнн актнвности

альдолазы (кетозо-1-фосфат-альдегид-лиаза, КФ 4.1.2.13) в сыворотке и эритроцитах крови больных раком гортани получены неоднозначные результаты (В. М. Лосицкая, 1966; Е. М. Грановская, 1972; А. А. Сквирская и соавт., 1973; Skoniezny, 1973; Siegel и соавт., 1975; Grundmann, Michalski, 1977), но бо́льшая часть данных свидетельствует о повышении активности этого фермента при данном заболевании. Изучение еще одного фермента гликолиза — энолазы (2-фосфо-D-глицерат-гидро-лиаза, КФ 4.2.1.11) — в эритроцитах больных раком гортани показало, что активность его остается в пределах нормы (В. М. Лосицкая, 1966).

В тканях злокачественных новообразований гортани снижается или полностью исчезает гликоген (Ю. Н. Зурнаджи, 1965; Н. А. Московченко и соавт., 1974); при раке гортани наблюдаются также определенные изменения уровня молочной и пировиноградной кислот в крови (А. И. Старостенко, 1963; З. П. Рыжко, 1968; Л. В. Усенко, Г. М. Тытарь, 1969; La Ferla, 1959).

Кроме гликолитических ферментов при раке гортани исследовали также активность ферментов аэробного окисления углеводов. Одним из них является сукцинатдегидрогеназа (сукцинат: /акцептор/ — оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1) — показатель интенсивности процессов цикла Кребса. Г. А. Автандилов и соавторы (1972) гистохимическими методами установили, что активность этого фермента в ткани злокачественных опухолей гортани увеличивалась почти в 3 раза по сравнению с макроскопически неизмененной слизистой оболочкой. Облучение приводило к снижению активности в тканях злокачественных опухолей в 4—6 раз. А. К. Борджадзе (1973) обнаружил снижение активности сукцинатдегидрогеназы в раковых тканях гортани по сравнению с нормой, причем ферментативная активность еще больше уменьшалась или не выявлялась вовсе после лучевой терапии. Противоречивые данные этих авторов, возможно, связаны с неоднородностью изучаемого материала, а также с различиями в методах исследования.

Известен еще один путь превращения углеводов в организме — пентозофосфатный цикл. По сообщению А. А. Сквирской и соавторов (1977), в эритроцитах крови больных раком гортани активность ферментов начальной фазы этого цикла отчетливо повышается.

Встречаются единичные работы по изучению при раке гортани некоторых ферментов, участвующих в превращении углеводных компонентов мукополисахаридов. Так, La Ferla (1959) обнаружил трехкратное увеличение в тканях злокачественных опухолей гортани активности β-глюкуронидазы (β-D-глюкуро-

нид-глюкуронгидролаза, КФ 3.2.1.31). По данным Gierek (1977), активность этого фермента повышается также в лимфоцитах крови больных раком гортани при отсутствии ее изменений в нейтрофилах. Она (Gierek, 1977) также установила, что в лимфоцитах и нейтрофилах крови возрастает активность N-ацетил-β-глюкозаминидазы (хитобиоза-ацетамидодезоксиглюкогидролаза, КФ 3.2.1.30). Небольшое увеличение активности этих ферментов обнаружено гистохимическими методами в ткани злокачественных опухолей полости носа (Ishii, 1972).

Известно, что по мере прогрессирования рака гортани в связи с локализацией опухолевого процесса развивается гипоксия. Так как в процессах дыхания важную роль играет фермент карбоангидраза (карбонат-гидро-лиаза, КФ 4.2.1.1), способствующий выведению углекислого газа из организма, его исследование при раке гортани может иметь диагностическое значение. Т. Е. Бровко (1959) обнаружила, что повышенная активность этого фермента в большем проценте случаев наблюдается при запущенных стадиях рака гортани, особенно при наличии стеноза. По мнению автора, это — результат компенсаторной реакции на накопление углекислоты в организме вследствие затруднения дыхания.

Содержащий медь белок α_2-глобулиновой фракции, церулоплазмин, обладающий способностью переносить медь в крови, проявляет также ферментативные свойства. Он катализирует окисление некоторых полиаминов, в том числе п-дифенолов и п-фенилендиаминов. Поэтому его называют п-фенолоксидазой (п-дифенол:кислородоксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2). По данным Э. Л. Зражвы (1966, 1971), активность этого фермента в сыворотке крови при раке гортани повышалась в 1,3—1,6 раза. Наибольшее увеличение характерно для III стадии заболевания. Несколько возрастала активность сывороточной п-дифенолоксидазы и при доброкачественных опухолях гортани (в среднем в 1,3 раза). В сыворотке крови больных раком гортани увеличивалось также содержание меди (в среднем в 1,4 раза), особенно при I стадии заболевания. Однако концентрация меди в сыворотке крови больных доброкачественными опухолями гортани существенно не изменялась. В то же время De Jorge и соавторы (1966) в сыворотке крови больных раком гортани не обнаружили изменения активности церулоплазмина при значительном увеличении (более чем в 2 раза) концентрации меди.

Ферменты обмена белков

В процессах пролиферации, инвазии, в стимуляции роста и нарушении свойств поверхности клеток злокачественных опухолей участвуют протеолитические ферменты (Farbiszewski, Worowski, 1975; Schnebli, 1974). Одним из характерных признаков метаболизма неопластических тканей является ярко выраженное несоответствие между реакциями синтеза и распада их структурных компонентов. Причиной этого явления могут быть глубокие нарушения гидролитического расщепления белков — протеолиза в организме больных с опухолью (Р. С. Овсесян, Р. Г. Мкртчян, 1977; Schnebli, 1974; Farbiszewski, Worowski, 1975).

В лаборатории биохимии Киевского научно-исследовательского института отоларингологии на протяжении ряда лет в ткани злокачественных новообразований и крови больных ЛОРонкологическими заболеваниями изучались различные системы, включающие протеолитические ферменты и их ингибиторы. Протеиназы в злокачественных опухолях гортани представлены ферментами с широкой и узкой субстратной специфичностью, действующие как в кислой, так и в слабощелочной среде. Общую протеолитическую активность тканей исследовали по расщеплению нескольких субстратов: естественных белков гемоглобина (pH 3), протамина (pH 7,6) и синтетического субстрата N-бензоил-L-аргининэтилового эфира — БАЭЭ (pH 7,8). Данные этих исследований суммированы в табл. 3. Как видно из табл. 3, ткани опухолей имеют достоверно повышенную активность кислых протеиназ (в 1,8 раза). При исследовании активности суммарного протеолиза, определяемого по расщеплению двух разных субстратов в слабощелочной среде, получены неоднозначные результаты. Скорость расщепления протамина (активность «нейтральной» протеиназы) в ткани раковых опухолей гортани возрастает в 2,4 раза, а БАЭЭ-эстеразная активность проявляет тенденцию к уменьшению. Полученные данные позволили предположить, что в протеолитическом расщеплении этих двух субстратов принимают участие различные группы ферментов.

Для углубления знаний о природе ферментов, участвующих в расщеплении протамина, изучена их внутриклеточная локализация (В. М. Лосицкая, 1973). В результате проведенных исследований установлено, что активность «нейтральной» протеиназы определяется во всех фракциях (табл. 4). Для опухолевой ткани и макроскопически неизмененной слизистой оболочки гортани наиболее высокая протаминрасщепляющая активность (ПРА) определялась в микросомальной фракции. Это понятно, так как

Таблица 3. *Активность протеолитических ферментов в тканях при раке гортани* ($M \pm m$)

Субстрат	pH	Опухоль	Макроскопически неизмененная слязистая оболочка	P	Авторы
Гемоглобин, мкмоль/(ч·мг белка)	3,0	0,71 ± 0,07	0,39 ± 0,05	<0,01	О. П. Голобородько и соавт., 1979
Протамин, мкг аргинина/(мг белка за 45 мин инкубации)	7,6	118,7 ± 12,4	48,1 ± 2,35	<0,001	В. М. Лосицкая, 1968
БАЭЭ, мкмоль БАЭЭ/(ч·мг белка)	7,8	2,3 ± 0,24	3,20 ± 0,37	>0,05	О. П. Голобородько и соавт., 1979

Примечание. Р вычислено по сравнению с данными для макроскопически неизмененной слизистой оболочки.

именно в ней содержатся лизосомы — клеточные элементы, в которых обычно локализуются протеолитические ферменты. По-видимому, повышение активности протеиназы в гомогенатах опухолевой ткани создается за счет значительного увеличения ее активности в микросомальной и митохондриальной фракции (см. табл. 4).

В ткани злокачественных опухолей и макроскопически неизмененной слизистой оболочке гортани исследовались ингибиторы протеолитических ферментов, которые являются важным фактором в регуляции их действия (В. М. Лосицкая, 1971). Активность ингибиторов определялась по способности гомогенатов ткани тормозить расщепление казеина трипсином, а активность протеолитических ферментов, как уже говорилось раньше,— по рас-

Таблица 4. *Протеолитическая активность в клеточных структурах опухолевой ткани у больных раком гортани* (M)

Фракция	Опухоль	Макроскопически неизмененная слизистая оболочка
Ядра	191	162
Митохондрии	194	98
Микросомы	306	216
Растворимая	44	45
Гомогенат	180	100

щеплению белка протамина. В ткани опухоли существует определенное соотношение между активностью протеолитических ферментов и их ингибиторов: в слизистой оболочке активность ингибиторов трипсина более чем в 2 раза выше, чем в опухоли, тогда как активность «нейтральной» протеиназы примерно в такой же степени ниже. Так, при раке гортани антитриптическая активность в опухолевой ткани составляет 1,8 мкг/мг белка, активность «нейтральной» протеиназы — 137 мкг/мг белка, в макроскопически неизмененной слизистой оболочке соответственно — 4,1 и 65 мкг/мг белка.

Как показали исследования В. М. Лосицкой (1968), в ткани злокачественных опухолей и непораженной слизистой оболочке ингибиторы протеолиза содержатся в растворимой цитоплазматической фракции, вследствие чего, по-видимому, в ней определяется самая низкая активность «нейтральной» протеиназы (см. табл. 4). Другие субклеточные структуры — ядра, митохондрии, микросомы — не имеют ингибитора. При исследовании распределения активности «нейтральной» протеиназы среди отдельных субклеточных фракций суммарная их активность превосходила ее в цельном гомогенате. Это, по-видимому, связано с наличием в гомогенате ингибиторов протеолиза, препятствующих ферментативному расщеплению протамина. При разделении фракций дифференциальным центрифугированием происходит разобщение протеиназ и их ингибиторов (последние, как отмечено выше, определяются только в растворимой фракции). В связи с этим действие протеиназ остальных фракций не ограничивается ингибитором и поэтому их суммарный протеолиз превышает таковой цельного гомогената.

Необходимо было выяснить, является ли ингибитор растворимой фракции опухолевой ткани специфическим ингибитором трипсина, который обнаружен в α_2-глобулиновой фракции сыворотки крови и представляет по своей природе α_2-макроглобулин (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1964). Ингибитор, имеющий свойства, характерные для сывороточного α_2-макроглобулина, (α_2-МГ), среди ингибиторов опухолевой ткани не обнаружен (В. М. Лосицкая, 1968).

Проведено также исследование антипротеолитической и протеолитической активности в раковых опухолях гортани с учетом морфологических особенностей их строения (М. А. Луценко, В. М. Лосицкая, 1970). Результаты исследований показали, что содержание ингибиторов протеиназ зависит от количества соединительной ткани и ее состояния (табл. 5). В раковой опухоли с хорошо выраженной соединительнотканной стромой относительное содержание ингибиторов трипсина было наибольшим и

Таблица 5. *Содержание ингибиторов и активность протеиназ в опухолях гортани с различными морфологическими особенностями (М)*

Объект исследования	Ингибиторы, мкг/мг белка	Протеолитическая активность, мкг/мг белка
Непораженная слизистая оболочка	4,00	64
Непораженная соединительная ткань	4,40	56
Опухоль		
с хорошо выраженной соединительнотканной стромой	3,8	120
с дистрофическими изменениями в строме	1,1	123
медуллярная форма	0,6	165
скиррозная форма	0,48	182

приближалось к их количеству в непораженной слизистой оболочке и соединительной ткани гортани. При резко выраженном фиброзе стромы, т. е. скиррозных формах раковой опухоли, содержание ингибиторов было незначительным. В раковых опухолях медуллярного строения, т. е. с незначительно выраженной соединительнотканной стромой, количество ингибиторов было близким к уровню, выявленному при скиррозных формах. В опухолях с дегенеративными (дистрофическими) изменениями в строме, которые сопровождались выраженной воспалительной инфильтрацией, уровень ингибитора трипсина был выше, чем в случаях скиррозной и медуллярной форм.

При изучении нейтральной протеиназы выявлено, что активность ее в опухоли, независимо от состояния стромы, примерно одинакова и значительно выше, чем в слизистой оболочке и окружающей соединительной ткани (см. табл. 5). В участках слизистой оболочки, прилежащих к раковой опухоли, активность нейтральной протеиназы была меньшей, чем в опухоли, тогда как величина ингибиторной активности превышала таковую в опухоли, о чем уже говорилось ранее. В соединительной ткани, расположенной в отдалении от опухоли, отмечалось значительное уменьшение активности протеиназы и увеличение активности ингибиторов по сравнению с опухолью.

Наряду с изучением протеолитических ферментов и их ингибиторов в ткани злокачественных новообразований гортани, большое внимание было уделено исследованию специфических антипротеиназ сыворотки крови у больных раком гортани (В. М. Лосицкая, 1971). Исследовалась способность сыворотки

Таблица 6. *Содержание антипротеиназ и α_2-МГ в сыворотке крови больных раком гортани ($M \pm \alpha_2$)*

Диагноз	Антитриптическая активность, мкг/мл	P	Антихимотриптическая активность, мкг/мл	P	α_2-макроглобулин, мкг/мл	P
Рак гортани						
I—II стадия	1678 ± 78	$>0{,}05$	1254 ± 204	$>0{,}05$	190 ± 15	$<0{,}001$
III »	2019 ± 39	$<0{,}001$	1294 ± 45	$<0{,}001$	187 ± 7	$<0{,}001$
IV »	2354 ± 110	$<0{,}001$	—		169 ± 7	$<0{,}05$
Доноры	1445 ± 28		1003 ± 32		122 ± 5	

Примечание. P вычислено по сравнению с соответствующими данными в группе доноров.

крови тормозить трипсин (антитриптическая активность) и химотрипсин (антихимотриптическая активность).

Из табл. 6 следует, что антитриптическая и антихимотриптическая активность сыворотки крови у больных раком гортани повышена, причем степень увеличения уровня ингибиторов протеиназ соответствует глубине процесса. После радикального удаления опухоли с благоприятным исходом содержание сывороточных ингибиторов протеиназ снижается до нормы. Повышенная в послеоперационном периоде концентрация ингибиторов протеолиза указывает на неблагоприятный прогноз и возможность скрытого метастазирования. Следовательно, динамика активности ингибиторов протеиназ в процессе лечения может в известной степени быть показателем тяжести заболевания и эффективности лечения.

Основная часть антитрипсина (90%) в сыворотке здоровых людей связана с α_1-глобулинами; с α_2-глобулинами связано всего 10% ингибитора (В. А. Белицер и соавт., 1967). Различий в распределении ингибиторов между α_1- и α_2-глобулиновыми фракциями крови у больных раком гортани не выявлено (В. М. Лосицкая, 1971).

Результаты изучения содержания α-МГ в сыворотке крови больных раком гортани также приведены в табл. 6. Оно достоверно повышено у больных со всеми исследованными стадиями заболевания, но степень увеличения больше при начальных стадиях ракового процесса.

Суммируя полученные данные о протеолитических ферментах и их ингибиторах в сыворотке крови и тканях злокачественных опухолей у больных раком гортани, можно заключить, что антипротеолитическая активность сыворотки крови является важным

критерием, который характеризует тяжесть патологического процесса.

На основании вышеизложенного можно предположить, что повышение уровня антипротеиназ сыворотки при новообразованиях является защитной реакцией организма в ответ на активацию протеолитических ферментов в опухолях.

Обнаружив в ткани злокачественных опухолей гортани определенные изменения активности «нейтральной» протеиназы и содержания ингибиторов протеолитических ферментов, В. М. Лосицкая (1973) провела сравнительное изучение их некоторых физико-химических свойств в норме и патологии. Активность «нейтральной» протеиназы исследовалась при разных значениях pH среды, температуры и в присутствии различных ингибиторов. Отмечено, что активность «нейтральной» протеиназы гомогенатов опухолевой ткани гортани зависит от pH среды: при pH 4 и 9 она наиболее низкая; оптимальная активность наблюдалась при значениях pH 6—7.

В специальных исследованиях сравнивалась чувствительность «нейтральной» протеиназы опухолевой ткани и макроскопически неизмененной слизистой оболочки гортани к температурному воздействию (В. М. Лосицкая, 1973). Такие исследования привлекают внимание потому, что при опухолевом росте появляются ферменты, однозначные по специфичности, но различающиеся по физико-химическим свойствам. Установлено, что ферментативная система, гидролизующая протамин при pH 7, 6, в обеих исследуемых тканях гортани чувствительна к повышению температуры, причем с увеличением температуры падение активности фермента становится все более значительным (табл. 7). Однако при всех исследованных значениях температуры «нейтральная» протеиназа опухолевой ткани отличается большей термостабильностью по сравнению с соответствующим ферментом макроскопически неизмененной слизистой оболочки.

Исследование влияния естественных ингибиторов протеолитических ферментов из бобов сои и картофеля на активность «нейтральной» протеиназы гомогенатов тканей гортани показало (см. табл. 7), что действие ее угнетается в присутствии этих веществ, однако величина и характер торможения в исследуемых тканях разные. Во-первых, «нейтральная» протеиназа обеих исследуемых тканей более чувствительна к ингибитору из картофеля. Во-вторых, в ткани злокачественных опухолей активность фермента под действием обоих ингибиторов угнетается в меньшей степени, чем в непораженной слизистой оболочке. Неодинаковую чувствительность протеиназы опухолевой ткани и макроскопически неизмененной слизистой оболочки гортани к

Таблица 7. *Влияние температуры и ингибиторов на активность нейтральной протеиназы тканей гортани при ее злокачественном поражении (М, в % торможения)*

Фактор	Опухоль	Макроскопически неизмененная слизистая оболочка
Температура, °С		
50	0	14
55	33	50
60	89	100
Ингибиторы (70—100 мкг)		
из бобов сои	32	47
из картофеля	44	63

температурному воздействию и влиянию ингибиторов, по-видимому, можно объяснить наличием в опухолевой ткани несколько иных по специфичности действия ферментов протеолиза.

Большое внимание также уделялось изучению качественных особенностей антипротеиназ сыворотки у больных раком гортани (В. М. Лосицкая, 1968). При сравнении величин температурной инактивации ингибиторов трипсина и химотрипсина цельной сыворотки больных и доноров заметных изменений не выявлено. Однако ингибиторы трипсина отдельных электрофоретических фракций (α_1- и α_2-глобулиновых) сыворотки крови больных раком гортани более стабильны к нагреванию по сравнению с ингибиторами соответствующих белковых фракций доноров. Ингибиторы протеолиза сыворотки крови больных раком гортани менее чувствительны и к различным значениям pH среды.

Механизм повышения устойчивости сывороточных ингибиторов протеолиза у больных раком гортани к различным физико-химическим воздействиям неясен. Повышение стабильности может быть связано с возникновением при раке несколько иных форм белковых ингибиторов, обладающих, в частности, пониженной способностью к тепловой коагуляции.

Ферменты и ингибиторы опухолевой ткани являются веществами более стойкими к различным воздействиям, например к повышению температуры, изменению pH среды и др. Повышенная стабильность этих компонентов в опухолевой ткани, по-видимому, является результатом усиления защитных механизмов в раковых клетках, что необходимо для их самосохранения. В ткани злокачественных новообразований гортани другой фермент — ЛДГ — является более стойким к хранению, чем в макроскопически неизмененной слизистой оболочке гортани: в экстрактах из ткани опухолей на 2-й день их хранения в холодильнике при 4° С теряется 16% активности фермента и на 3-й — 25, а в экстрактах из макроскопически неизмененной слизистой оболочки гортани — соответственно 32 и 43%.

Кроме суммарного протеолиза и его ингибиторов при раке гортани претерпевают изменения и другие системы протеолитических ферментов. Так. Mali и соавторы (1976) в сыворотке крови больных раком гортани обнаружили значительное увеличение фибринолитической активности и некоторое снижение интенсивности фибринолиза после радиотерапии. Уменьшение фибринолитической активности крови в случаях улучшения клинического состояния больных отмечалось чаще, чем когда улучшения состояния не наблюдалось. Другие авторы (Т. Е. Бровко, А. И. Кизим, 1969, 1971; А. И. Нестеров, 1969; А. М. Шевченко, С. В. Меркулова, 1975; Niksic, Balogh, 1976) также отмечали увеличение фибринолитической активности крови у больных раком гортани на фоне повышенной ее способности к коагуляции.

Известно, что инвазия опухолей связана с распадом основного структурного белка коллагена. В ткани раковых опухолей гортани фермент коллагеназа (клостридиопептидаза А, КФ 3.4.4.19), расщепляющий этот белок, обладал значительно большей активностью, чем в непораженной слизистой оболочке. Более высокая коллагеназная активность коррелировала с большей агрессией рака гортани (Abramson и соавт., 1975; Cheng Chun Huang и соавт., 1976).

Предполагают, что в нарушении проницаемости клеток злокачественных опухолей и распространении опухолевых клеток по организму могут принимать участие кинины, в образовании и распаде которых участвуют протеолитические ферменты — кининогеназы и кининазы. Мы (О. П. Голобородько и соавт., 1979) обнаружили в тканях гортани мощную систему кининразрушающих ферментов, а также активность кининогеназ. Однако существенных изменений этих показателей в раковых тканях гортани по сравнению с макроскопически неизмененной слизистой оболочкой выявлено не было.

Рак гортани вызывает также глубокие функциональные нарушения в желудочно-кишечном тракте. Так, А. М. Макуха (1970) при данном заболевании обнаружил резкое снижение содержания протеолитического фермента пепсина (КФ 3.4.23.1) в желудочном соке, причем с распространением опухоли пепсинобразующая функция желудка угнетается все больше. После ларингэктомии в ближайшем послеоперационном периоде ни у одного больного содержание пепсина не приблизилось к величинам, принятым за норму. Пепсинобразующая функция у больных, которым была произведена ларингэктомия, и в отдаленном периоде остается угнетенной.

При раке гортани нарушаются не только ферментативные системы, катализирующие расщепление белков, но и активность

ряда ферментов, участвующих в обмене отдельных аминокислот. В частности, активность глутаматдегидрогеназы (*L*-глутамат: НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.2), катализирующей реакцию, которая является связывающим звеном в обмене промежуточных продуктов метаболизма белков и цикла Кребса, в ткани злокачественных новообразований гортани возрастает почти в 3 раза по сравнению с непораженной слизистой оболочкой. Облучение вызывает снижение ферментативной активности в 4—6 раз (Г. Г. Автандилов и соавт., 1972). В сыворотке крови больных раком гортани активность других ферментов аминокислотного обмена — аспартат-аминотрансферазы (*L*-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1) и аланинаминотрансферазы (*L*-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2) — повышена незначительно или находится в пределах нормальных колебаний (Е. М. Небожина, 1968; Е. М. Грановская, 1972). В эритроцитах крови больных раком гортани изменения активности этих ферментов были более выраженными: активность аспартат-аминотрансферазы возрастала в 1,8 раза, а аланинаминотрансферазы — в 2,5 раза (Е. М. Грановская, 1972; А. А. Сквирская и соавт., 1973).

Нуклеазы и нуклеиновые кислоты

Усиленный при малигнизации биосинтез белка, приводящий к росту злокачественных опухолей, является следствием нарушения в бластоматозной ткани свойств и функционирования нуклеиновых кислот. В связи с этим изучению обмена этих соединений, обеспечивающих рост, развитие, дифференцировку клеток, передачу наследственной информации и закрепление наследственных признаков при злокачественных новообразованиях различных локализаций, уделяется много внимания.

К. Н. Веремеенко и соавторы (1970) установили наличие определенных изменений нуклеинового обмена в ткани раковых опухолей гортани. Так, последние содержат более высокие количества рибонуклеиновых кислот (26,8 мг%) по сравнению с макроскопически неизмененной слизистой оболочкой (15,4 мг%).

Увеличение содержания рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот в ткани злокачественных опухолей гортани отметили также и другие авторы (Е. З. Мирошникова, А. А. Жирнова, 1967; Г. М. Мнухина, 1967; З. Д. Кицманюк, Г. И. Бахарева, 1973). Значительно менее выражено возрастание количества нуклеиновых кислот в папилломах и тканях гортани при ограниченном хроническом гиперпластическом процессе (Е. З. Мирошникова, А. А. Жирнова, 1967; Г. М. Мнухина, 1967). Более дли-

тельно происходит синтез дезоксирибонуклеиновых кислот в тканях злокачественных опухолей гортани по сравнению с папилломами (Fabricant, 1970).

К. Н. Веремеенко и соавторы (1970) исследовали активность ферментов, деполимеризующих нуклеиновые кислоты,— дезоксирибонуклеазы (дезоксирибонуклеинат-3-нуклеотидгидролаза, КФ 3.1.4.6) и рибонуклеазы (рибонуклеинат-нуклеотидо-2-трансфераза, КФ 3.1.4.23). Активность кислых нуклеаз в ткани злокачественных опухолей гортани была ниже, чем в макроскопически неизмененной слизистой оболочке (соответствующие данные для рибонуклеазы равны 277 и 321 условных единиц, а для дезоксирибонуклеазы — 250 и 294 условных единиц).

На основании полученных данных авторы предложили использовать экзогенные нуклеазы в терапевтических целях, основываясь на том, что снижение количества нуклеиновых кислот в клетках опухолей может повлечь за собой замедление в них интенсивности синтеза белков, которые идут на увеличение их массы. Биохимические обоснования возможности терапевтического применения рибонуклеазы в комплексном лечении больных раком гортани подробно изложены дальше.

Облучение в первое время приводит к увеличению активности нуклеаз в раковых опухолях гортани (А. Ф. Карась, 1973), что, возможно, является одним из слагаемых терапевтического эффекта лучевой терапии.

Изменения количества нуклеиновых кислот и активности ферментов их обмена в тканях злокачественных опухолей гортани не специфичны, так как содержание нуклеиновых кислот увеличивается при раке различных локализаций. Однако с учетом клинического течения болезни и в совокупности с другими методами исследования изучение этих показателей при раке ЛОРорганов можно использовать в качестве дополнительных диагностических критериев.

Ферменты обмена фосфора

В литературе имеются также данные об изменениях активности ферментов, участвующих в фосфорном обмене и катализирующих гидролитическое расщепление эфиров фосфорной кислоты, в жидкостях и тканях организма больного с опухолью. В крови больных раком ЛОРорганов изучалась активность щелочной (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, КФ 3.1.3.1) и кислой (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, КФ 3.1.3.2) фосфатаз. Как было установлено, показатели активности сывороточной щелочной фосфатазы при

раке гортаии (Е. И. Митрофаиова, 1965) и злокачественных опухолях носа (Ishii, 1972) ие выходят за пределы нормы. В то же время, по данным Р. А. Казарьянца (1968), в лейкоцитах крови больных раком гортаин ферментатнвная активность возрастает в среднем более чем в 3 раза; у больных доброкачественными опухолями и прн благопрнятном нсходе ларннгэктомни прн выписке больных актнвиость этого фермента находилать в пределах нормальиых величнн.

Активность кислой фосфатазы в сыворотке крови больных раком гортани увелнчивается по мере развнтня заболевания: при I стадии злокачественного процесса нарастанне ее выражено в меньшей степени, чем при III стадин (Е. И. Мнтрофанова, 1965). После комбнннрованного лечения прн отсутствни рецидивов и метастазов активность кнслой фосфатазы сывороткн у большинства лнц сннжается до нормальных величии, чего не наблюдается у больных с рецидивамн опухолей и метастазами в лнмфатические узлы шеи. Gierek н соавторы (1977) обнаружили также повышенне активности кислой фосфатазы в лнмфоцнтах и нейтрофилах крови больных раком гортанн.

Таким образом, измененя актнвности кислой фосфатазы в сыворотке кровн в дннамике заболевания и лечения больных раком гортани могут в известной степенн служить показателем эффективности тех или иных методов терапии. Для ранней диагностикн этого заболевания определение актнвностн сывороточной кнслой фосфатазы большого значения не имеет в связи с мало выраженным увеличением ферментатнвиой активиости прн начальных стадиях болезни.

Актнвность кислой фосфатазы в сыворотке крови не изменяется при злокачественных новообразованиях носа, но снльно увеличивается в ткани самих опухолей (Ishii, 1972). В то же время, по данным этого автора, актнвиость щелочной фосфатазы в ткани злокачественных опухолей иоса существеино ие изменяется.

Из специфических фосфатаз при раке ЛОРорганов исследовали активность фермента АТФ-азы (АТФ-фосфогидролаза, КФ 3.6.1.3), участвующего в фосфоэнергетическом обмене (Ellegaard и соавт., 1975). У большннства больных раком полостн рта, глоткн н гортаии в лимфоцнтах крови зиачнтельно увеличнвается актнвность этого фермента. При благоприятном исходе болезнн после лечения активность лимфоцитарной АТФ-азы снижается, а при неблагоприятиом — остается повышенной. Эти результаты позволнли авторам предложить указаниый биохимическнй тест в качестве диагностического н прогиостнческого. Гистохимические исследоваиия активиости АТФ-азы в ткаиях

злокачественных опухолей носа показали, что при данном заболевании активность этого фермента не отличается от таковой в непораженной слизистой оболочке (Ishii, 1972).

Ферменты обмена липидов

Большой интерес представляет изучение ферментов, участвующих в обмене липидов. Известно, что липиды являются составными компонентами клеток и неклеточных структур, они участвуют в построении и функционировании многообразных биологических мембран, синтезе простагландинов и др.

Обмен липидов в тканях злокачественных опухолей и крови больных раком гортани мало изучен. Однако имеются данные о том, что раковые опухоли гортани характеризуются значительным содержанием липидов разнообразной химической структуры, которые представлены нейтральными липидами, фосфатидами, ацетальфосфатидами, ненасыщенными липидами, что, вероятно, связано с изменениями их метаболизма (Л. С. Сенченко, 1974). Из ферментов, участвующих в обмене липидов, в ткани злокачественных новообразований гортани исследовали активность глицерофосфатдегидрогеназы (L-глицерол-3-фосфат: (акцептор)-оксидоредуктаза, КФ 1.1.99.5). Реакция с участием глицерофосфатдегидрогеназы служит промежуточным этапом, через который продукты обмена глюкозы могут включаться в синтез липидов. Было показано, что активность цитоплазматической глицерофосфатдегидрогеназы увеличивалась в ткани раковых опухолей гортани примерно в 4 раза, а митохондриальной — снижалась на 15%. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе малигнизации эпителия гортани наблюдается интенсификация липидного обмена, лучевое лечение вызывает снижение активности цитоплазматического фермента в 4—6 раз по сравнению с необлученными опухолями и на $^{1}/_{3}$ уменьшение активности митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы (Г. Г. Автандилов, 1972).

Развитие злокачественных новообразований ЛОРорганов сопровождается существенными нарушениями ряда ферментативных систем как в ткани самих опухолей, так и в сыворотке крови больных. Наиболее изученные из них могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических тестов при данных заболеваниях.

В связи с тем что получение крови технически более просто и менее травматично, чем взятие тканевой биопсии, главное значение придается тем изменениям активности ферментов, которые наблюдаются в сыворотке крови больных раком ЛОРорганов.

При раке гортани диагностическое значение может иметь определение активиости сывороточного гликолитического фермента гексокииазы. Содержание сывороточиых ингибиторов протеолиза может быть показателем тяжести заболеваиия и эффективности лечения. Для диагностики рака гортаии можио рекомендовать определение в сыворотке крови ингибитора протеолитических ферментов — α_2-МГ, количество которого больше повышается при начальных стадиях заболевания. В качестве дополнительного диагностического критерия можно использовать определение активиости кислой фосфатазы в сыворотке крови больиых раком гортани. Важную информацию о природе опухолевого процесса может дать определение в ткани раковых опухолей и крови больиых раком гортани активиости протеиназ и их иигибиторов, а также содержания нуклеиновых кислот и ферментов, участвующих в их катаболизме.

Из ферментов, активиость которых в ткаиях злокачественных опухолей отличается от таковой в макроскопически неизмеиеиной слизистой оболочке, наибольшее диагностическое и дифференциально-диагностическое значеиие имеет ЛДГ. Повышение активности этого фермента обиаружеио в ткаии злокачествеиных опухолей гортани различиыми методами исследоваиия. Для определения активности ЛДГ описаииым иами биохимическим методом можио использовать биоптаты тканей и требуется всего 2—3 ч. Исследование активиости лактатдегидрогеназы в растворимой фракции опухолевой ткани может в зиачительиой степени дополнить методы раиней диагностики рака гортани и должно шире внедряться в ЛОРоикологию.

ФЕРМЕНТЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКИХ ТОНЗИЛЛИТОВ

Несмотря на миоголетие исследования физиологии и патологии лимфоглоточного кольца, проблема тонзиллитов занимает одио из ведущих мест в отоларингологической науке и практике. Заболеваемость населения хроническим тонзиллитом высокая в разиых возрастных группах. По статистическим обобщениым даииым, в нашей страие им страдает 3—4% населения (Н. А. Преображеиский, 1972).

Патология нёбных миидалин за последнее десятилетие изучалась в разных направлениях. Достигнуты значительные успехи в диагностике и методах лечения, однако главный аспект этой проблемы — этиология и патогеиез хронического тоизиллита — в настоящее время еще окоичательно не выяснеи. Важиое место в формироваиии патологических сдвигов в лимфоглоточном

кольце отводится местным процессам, связанным с нарушением метаболизма, характер и специфика которого зависят от глубины, степени выраженности воспалительных реакций.

Нёбные миндалины являются активно функционирующим органом, участвующим в различных видах обмена: белковом, углеводном, липидном и др. В настоящее время имеются основания считать, что основные стороны метаболизма органов и тканей, в том числе и нёбных миндалин, определяются набором ферментов, их специфичностью и высокой каталитической активностью. Поэтому знание особенностей ферментативных систем миндаликовой ткани в норме и патологии необходимо для расшифровки патогенеза, диагностики и оценки клинических проявлений хронического тонзиллита.

Ферменты протеолиза при хроническом тонзиллите

При выяснении биологических особенностей лимфоэпителиальной ткани нёбных миндалин и механизмов, лежащих в основе их патологии, заслуживают особого внимания материалы, касающиеся изучения энзиматических систем, в частности ферментов системы протеолиза, которой отводится первостепенная роль в физиологии и патологии организма. Эта группа ферментов, наряду с участием в катаболизме белков, играет важную роль во многих жизненно важных процессах: свертывании крови, фибринолизе, иммунозащитных реакциях и др.

В последние годы расширилось представление о физиологическом значении ферментов системы протеолиза. Показано их участие в реакциях ограниченного протеолиза с образованием биологически активных веществ — ферментов, гормонов, биопептидов, а также в поддержании постоянного ионного баланса тканей и жидкостей, барьерной регуляции биологических мембран кровеносных сосудов и тканей.

Согласно последним данным, активирующее влияние гормонов на аденилциклазную систему осуществляется посредством протеиназы, связанной с мембранами клетки (Richert, Ryan, 1977).

В условиях патологии протеиназы могут выступать как медиаторы воспаления. Они проявляют свое протеолитическое действие либо непосредственно, влияя на белки клеточных структур, сосуды, либо косвенным путем, посредством образования важнейших медиаторов, в частности вазоактивных полипептидов — кининов. Физиологическое значение последних связано с регуляцией местного кровотока и капиллярной проницаемости. При патологии, когда создаются условия для избыточного их

образования, вследствие активации кининогеназ биопептиды могут быть ответственными за развитие воспалительных реакций, усиление эмиграции лейкоцитов, повышение сосудистой и тканевой проницаемости, появление отека, боли, деструкции тканей, т. е. могут вызывать те типичные признаки, которые характерны для патологии нёбных миндалин при остром и хроническом тонзиллите (М. С. Суровикина, 1971, К. Н. Веремеенко, 1977, и др.)

Вышеприведенные сведения теоретически обосновывают важность исследования протеолитических ферментов в нёбных миндалинах.

Протеиназы нёбных миндалин. В настоящее время мы располагаем данными, указывающими на наличие протеолитических ферментов в нёбных миндалинах, которые проявляют каталитическую функцию при различных значениях pH среды.

Н. Г. Гефен (1966) приводит данные о наличии в миндалинах больных хроническим тонзиллитом катепсинов, которые в кислой среде (pH 3,5) способны гидролизовать гемоглобин. Выявленная активность приблизительно равнялась уровню активности катепсинов белого вещества головного мозга, была несколько выше, чем в мышечной ткани, но ниже активности протеиназ тканей селезенки и печени. Не выявлено существенных различий в ферментативной активности в зависимости от клинической формы заболевания, но отмечены значительные колебания по возрастным группам и тенденция к снижению активности фермента по мере отягощения патологического процесса в нёбных миндалинах и общей клинической картины заболевания. Автор отмечает, что интенсивность катаболических процессов в миндаликовой ткани взрослых больных ниже, что, по-видимому, связано с ослаблением ферментативной активности кислых катепсинов. У детей, страдающих хроническим тонзиллитом, частое и активное проявление местной воспалительной реакции в нёбных миндалинах характеризуется выраженным повышением активности катепсинов. Можно предположить, что одним из факторов биологической перестройки миндаликовой ткани, сопровождающейся ослаблением очаговой воспалительной реакции с возрастом, может быть нарушение метаболических процессов, связанных с участием протеиназ, когда проявление иммунозащитных свойств при хроническом тонзиллите протекает без резко выраженного воспаления.

Ряд авторов изучили некоторые физико-химические свойства кислых протеиназ. Согласно Sasaki, Kobe (1972), катепсиноподобные ферменты тонзилл имеют оптимум pH 3—4 и по своей природе близки к катепсину Д, активируются цистеином, рези-

стентны к трасилолу и этилен-диамин-тетраацетату (ЭДТА), ингибируются амидометил-циклогексан-карбоновой кислотой.

В последние годы изучаются функциональные свойства лимфоцитов тонзилл в норме и патологии, их роль в иммунобиологических процессах, антибактериальном иммунитете, синтезе иммуноглобулинов и образовании антител. Для расшифровки особенностей метаболизма лимфоцитов, а также механизмов, лежащих в основе их иммунозащитных свойств, значительный интерес представляет изучение специфики обмена веществ.

В работах К. Н. Веремеенко, Л. И. Волохонской (1976, 1977) проведено изучение кислых протеиназ с широкой и ограниченной субстратной специфичностью в гомогенатах и субклеточных структурах лимфоцитов, полученных из нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом с различными клиническими проявлениями этого заболевания (табл. 8, 9).

Субклеточные фракции получали путем дифференциального центрифугирования гомогенатов лимфоцитов в изотоническом растворе сахарозы (0,25 М), соответственно условиям осаждения обозначались как ядерная фракция (700g, 10 мин), митохондриальная (6000g, 15 мин), лизосомальная (21 000g, 15 мин) и растворимая.

Как видно из табл. 8, в гомогенатах и субклеточных фракциях лимфоцитов содержатся кислые протеиназы с оптимумом действия при pH 3,5. Наиболее высокая активность фермента выявлена в растворимой фракции, самая низкая — в ядерной. Активность кислых протеиназ в лизосомальной и митохондриальной фракциях была практически одинаковой. Отмечено повышение катептической активности субклеточных фракций в зависимости от степени проявления патологического процесса в миндаликовой ткани.

У больных с декомпенсированной формой тонзиллита, у которых кроме периодических ангин (5—7 раз в году) наблюдались в анамнезе паратонзиллиты и симптомы тонзиллогенной интокси-

Таблица 8. *Активность кислых протеиназ в гомогенатах и субклеточных фракциях лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом ($M \pm m$)*

Объект исследования (фракции)	Удельная активность, мкг тирозина/мин	
	Субкомпенсированная форма	Декомпенсированная форма
Ядерная	1,3 ± 0,23	1,7 ± 0,39
Митохондриальная	2,3 ± 0,49	2,0 ± 0,66
Лизосомальная	2,0 ± 0,29	2,3 ± 0,56
Растворимая	4,1 ± 0,43	4,8 ± 1,01
Гомогенат	2,3 ± 0,15	3,0 ± 0,81

Таблица 9. *Удельная активность кислых кининогеназ (нг брадикинина/ч) в субклеточных фракциях лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом*

Фракция	Субкомпенсироаанная форма	Декомпенсироаанная форма
Ядерная	63,8	96,0
Митохондриальная	60,0	87,0
Лизосомальная	92,0	71,0
Растворимая	28,0	24,2
Гомогенат	29,4	32,0

кации (субфебрилитет, боли в области сердца, суставах и др.), существенно повышалась активность кислых протеиназ во всех субклеточных фракциях лимфоцитов, за исключением митохондриальной.

В специальных опытах с применением биологического теста показано, что интактные лимфоциты, их гомогенаты, а также субклеточные структуры содержат специфические протеиназы, образующие кинины из кининогена в кислой среде с максимальным проявлением активности при pH 3,0. Наиболее высокая ферментативная активность присуща ядерной и лизосомальной фракциям, незначительная (около 15—20% всей активности) — растворимой фракции (табл. 9). Эти данные совпадают с результатами, полученными Engleman и Greenbaum (1971) для лимфоцитов крови. Авторы установили, что основная активность кининобразующих ферментов сконцентрирована в лизосомальной и ядерно-мембранной фракциях лимфоцитов.

При усилении воспалительного процесса повышалась активность этих ферментов в ядерной и митохондриальной фракциях, снижалась — в лизосомальной фракции. Увеличение активности кининогеназ в ядерной и митохондриальной фракциях лимфоцитов тонзилл больных с декомпенсированной формой заболевания, вероятно, может быть обусловлено переходом их из других субклеточных структур, в частности лизосом, барьерная функция которых нарушается в условиях воспаления.

На основании представленных сведений можно предположить, что в условиях усиления патологического процесса в очаге воспаления значительную роль в поддержании функциональных возможностей нёбных миндалин, по-видимому, играют протеолитические ферменты, проявляющие свои действия в кислой среде.

Согласно данным последних лет, важную роль во многих процессах жизнедеятельности организма играют активные в нейтральной среде тканевые протеолитические ферменты, которые участвуют в образовании биопептидов (кининов, ангиотензинов и др.), превращении фибриногена в фибрин, проколлагена в

коллаген и др. Эта группа ферментов не была изучена в нёбных миндалинах. Значительный вклад в изучение нейтральных протеиназ в миндаликовой ткани внесли экспериментальные и клинические исследования, выполненные сотрудниками лаборатории биохимии Киевского НИИ отоларингологии.

А. И. Кизим, О. Ф. Мельников (1972, 1974) показали, что в условиях экспериментального стрептококкового тонзиллита в тканях нёбных миндалин собак наблюдается активация системы нейтральных протеиназ, о чем свидетельствует достоверное повышение протаминрасщепляющей активности, БАЭЭ-эстеразной активности и усиление каталитической способности гидролиза субстрата гиппурил-L-лизина (ГЛ) гомогенатами миндаликовой ткани.

К. Н. Веремеенко и соавторы (1972, 1974, 1978) установили, что гомогенаты тонзилл больных обладают значительной протеолитической активностью по отношению ко многим естественным и синтетическим субстратам: протаминсульфату, казеину, N-бензол-DL-аргинин-пара-нитроанилиду (БАПНА), N-бензоил-L-аргининэтиловому эфиру (БАЭЭ), ГЛ. Причем у больных с декомпенсированной формой заболевания, по сравнению с субкомпенсированной, изменения в активности нейтральных протеиназ в тканях тонзилл имели более выраженный характер, о чем свидетельствует значительное повышение общей ПРА. Кроме того, в тканях нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом с различной давностью заболевания выявлена определенная направленность изменений в активности протеиназ, функционирующих при слабощелочном значении pH среды.

При длительном заболевании хроническим тонзиллитом (6—15 лет) отмечено нарастание протеолитической активности при использовании всех субстратов по сравнению с данными, установленными у больных с давностью заболевания 1—5 лет. Очевидно, в условиях длительного воспалительного процесса в нёбных миндалинах происходит активация энзиматической системы протеолиза (в аэробных условиях). При затяжном течении хронического тонзиллита (свыше 15 лет) активность протеиназ, функционирующих в слабощелочной среде, падает, что, вероятно, обусловлено дистрофическими изменениями, нарушениями дифференцировки клеток, антителообразования, фагоцитоза, а также замещением активной лимфоидной ткани соединительной, значительно менее активной в метаболическом отношении.

Исследовалась также активность нейтральных протеиназ в лимфоцитах и их распределение в субклеточных структурах. Гомогенаты лимфоцитов и их субклеточные структуры при физиологических pH (7,2—7,5) обладали высокой протеолитиче-

Таблица 10. *Протаминрасщепляющая активность в гомогенатах и субклеточных фракциях лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом* ($M \pm m$)

Объект исследования (фракции)	Удельная активность, нмоль аргинина/мин		
	Субкомпенсированная форма	Декомпенсированная форма	
Ядерная	6,0±1,06	20,1±2,40	P<0,001
Митохондриальная	15,0±2,47	21,0±6,45	P<0,5
Лизосомальная	16,0±2,18	28,5±3,45	P<0,01
Растворимая	12,1±2,06	31,1±5,07	P<0,001
Гомогенат	10,1∓4,30	23,0±2,27	P<0,001

ской активностью в отношении белковых и низкомолекулярных синтетических субстратов.

Максимальные значения ПРА характерны для лизосомальной фракции, наименьшие — для ядерных структур. Выявлены отличия в общей активности нейтральных протеиназ лимфоцитов у больных с различными клиническими формами заболевания (табл. 10). У лиц с декомпенсированной формой тонзиллита обнаружено статистически достоверное нарастание ПРА в цельном гомогенате, ядерной, лизосомальной и растворимой фракциях по сравнению с соответствующими фракциями лимфоцитов, выделенных из нёбных миндалин больных с субкомпенсированной формой заболевания.

Значительное нарастание в 2,6 раза ПРА в растворимой фракции лимфоцитов миндаликовой ткани больных с декомпенсированной формой заболевания, по-видимому, является следствием повреждения лизосомальных мембран и изменения морфологических структур митохондрий, на что указывают В. И. Андрейченко, Л. П. Калиновская (1974).

Сравнивая активность нейтральных протеиназ в лимфоидных клетках больных ангинами в различные сроки после произведенной тонзиллэктомии, К. Н. Веремеенко и соавторы (1976) обнаружили, что уровень ПРА был тем выше, чем короче промежуток времени между острым воспалением и оперативным вмешательством.

О важности нейтральных протеиназ в общем метаболизме нёбных миндалин свидетельствует тот факт, что их активность значительно превышает таковую других лимфоидных органов и тканей — селезенки, лимфоузлов (Э. В. Гюллинг, А. И. Кизим, 1974).

Следовательно, нейтральные протеиназы присутствуют практически во всех структурных компонентах лимфоцитов, хотя максимум их активности выявлен в лизосомах и митохондриях (К. Н. Веремеенко, Л. И. Волохонская, 1972, 1978).

Согласно нашим и литературным данным (В. И. Шведова, 1977), высокая удельная активность нейтральных протеиназ в ряде органов присуща как лизосомальной, так и митохондриальной фракциям, в которых протекает основной биоэнергетический процесс — терминальное окисление. Эти сведения указывают не только на интенсивность белкового метаболизма митохондрий, но и на взаимосвязь биологического окисления и протеолиза.

Таблица 11. *БАЭЭ-эстеразная активность гомогенатов и субклеточных фракций лимфоцитов нёбных тонзилл больных хроническим тонзиллитом ($M \pm m$)*

Объект исследования (фракции)	Удельная активность, нмоль бензоил-аргинина/мин	
	Субкомпенсированная форма	Декомпенсированная форма
Ядерная	450±53,3	540±53,7
Митохондриальная	700±83,1	740±43,8
Лизосомальная	850±76,7	1100±104,2
Растворимая	750±111,6	580±69,2
Гомогенат	380±39,1	280±34,1

Для идентификации нейтральных протеиназ лимфоцитов тонзилл, которые, вероятно, представляют сумму эндо- и экзопептидаз, были использованы низкомолекулярные синтетические субстраты: БАЭЭ, БАПНА и ГЛ.

Таблица 12. *Расщепление БАПНА гомогенатами и субклеточными структурами лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом ($M \pm m$)*

Объект исследований (фракции)	Удельная активность, нмоль паранитроанилина/мин	
	Субкомпенсированная форма	Декомпенсированная форма
Ядерная	0,20±0,01	0,35±0,04
Митохондриальная	0,41±0,07	0,43±0,07
Лизосомальная	0,35±0,08	0,48±0,05
Растворимая	0,33±0,05	0,46±0,06
Гомогенат	0,25±0,03	0,30±0,04

Протеиназы гомогенатов и субклеточных структур лимфоидных клеток тонзилл интенсивно расщепляли БАЭЭ и очень слабо БАПНА — специфический субстрат трипсина (табл. 11, 12). Скорость гидролиза субстрата БАЭЭ отдельными фракциями лимфоцитов была неодинакова: лизосомальная фракция расщепляла БАЭЭ с наибольшей скоростью, ее удельная активность в 2 раза превышала показатели

Таблица 13. *Удельная активность нейтральных кининогеназ (нг брадикинина/ч) в субклеточных фракциях и гомогенатах лимфоцитов тонзилл больных хроническим тонзиллитом*

Объект исследования (фракции)	Субкомпенсированная форма	Декомпенсированная форма
Ядерная	63,0	110,0
Митохондриальная	93,0	102,0
Лизосомальная	108,0	72,6
Растворимая	13,0	18,0
Гомогенат	15,0	24,6

ядерной фракции и почти в 3 раза — гомогената. Фракции ядер, митохондрий и лизосом нёбных миндалин больных с декомпенсированной формой обладали более повышенной способностью расщеплять БАЭЭ, чем аналогичные фракции лимфоцитов тонзилл больных с субкомпенсированной формой хронического тонзиллита.

Трасилол — поливалентный ингибитор протеиназ, в концентрациях 100—200 КИЕ в пробе угнетает БАЭЭ-эстеразную активность, причем степень торможения для различных образцов лимфоидных клеток неодинакова и составляет от 15% до 50% исходной активности.

Полученные данные позволили предположить, что выявленные протеиназы лимфоцитов по специфичности близки к энзимам типа плазменных калликреинов, катализирующих образование активных веществ — кининов. Это послужило основанием для проведения исследований ферментов, вызывающих образование и распад кининов. Было установлено, что гомогенаты и субклеточные фракции лимфоцитов содержат ферменты, катализирующие расщепление кининогена в слабощелочной зоне (табл. 13), проявляющие максимальную активность при pH 7,5. Максимальная активность нейтральных кининогеназ выявлена в лизосомальной, митохондриальной и ядерной фракциях и незначительная — в растворимой фракции, показатель которой составлял в среднем около 15% общей активности. Выявлена корреляционная зависимость активности кининогеназ от клинической формы заболевания.

Проведено сравнительное изучение чувствительности кининогеназ, функционирующих в кислой и слабощелочной среде, к ингибиторам протеолитических ферментов. Установлено, что ингибиторы протеиназ искусственного и природного происхождения по-разному влияют на кининогеназную активность лимфоидных клеток тонзилл (табл. 14). Синтетический ингибитор потеиназ ε-аминокапроновая кислота (ε-АКК) не оказывает ингибирующего эффекта на «кислые» кининогеназы и очень слабо тормозит «нейтральные» кининобразующие ферменты гомогенатов лим-

Таблица 14. *Влияние ингибиторов протеиназ на кининогеназную активность гомогенатов и субклеточных фракций лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом*

Объект исследоаания (фракции)	Исходная актнаность, %	Оставшаяся активность фермента а % от исходной, принятой за 100%, прн действии ингибиторов протеиназ							
		соевый ингибитор трипсина		овомуконд		·контрикал		ε-АКК	
		pH 7,6	pH 3,0	pH 7,6	pH 3,0	pH 7,6	pH 3,0	pH 7,6	pH 3,0
Ядерная	100	37	78	60	80	30	—	73	84
Митохоидрн-альиая	100	30	62	59	67	25	—	76	100
Лизосомаль-ная	100	28	64	76	69	81	—	93	98
Растворимая	100	52	74	38	97	55	—	89	95
Гомогенат	100	55	59	87	63	61	—	86	91

фоцитов и их отдельных субклеточных фракций. Контрикал вызывает торможение «нейтральных» кининогеназ, соответствующих фракций лимфоцитов в среднем на 40—70%, однако «кислые» кининобразующие ферменты резистентны к нему. Соевый ингибитор трипсина (СИТ) действует на «нейральные» кининобразующие энзимы аналогичнно контрикалу. Он вызывает также незначительное торможение и кислых кининогеназ. Овомукоид угнетает действие кислых и «нейтральных» кининобразующих ферментов лимфоцитов и их структурных компонентов, но его ингибирующий эффект ниже, чем СИТ и контрикала.

Обнаруженная местная активация системы протеолиза непосредственно в миндаликовой ткани может служить предпосылкой к проведению исследований, направленных на выяснение возможности применения ингибиторов протеолиза в комплексной терапии хронических тонзиллитов.

К. Н. Веремеенко и соавторы (1977) провели исследования по выявлению в тонзиллах ферментов, катализирующих расщепление кининов. Активность кининрасщепляющих ферментов изучали при использовании брадикинина и ГЛ. Оптимум активности фермента находился при слабощелочном значении pH (7,4). С целью выяснения природы фермента, его связи с клеточными структурами изучена внутриклеточная локализация кининазы в лимфоцитах, выделенных из нёбных миндалин 32 больных хроническим тонзиллитом (табл. 15). При использовании брадикина кининазная активность определялась во всех

Таблица 15. *Удельная активность кининразрушающего фермента в гомогенатах и субклеточных фракциях лимфоцитов нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом*

Форма тонзиллита	Лг брадикинина/ч					Нмоль гиппурил-L-лизина/ч				
	Гомогенат	Растворимая	Ядерная	Митохондриальная	Лизосомальная	Гомогенат	Растворимая	Ядерная	Митохондриальная	Лизосомальная
Субкомпенсированная	978	2700	804	780	807	15,0	90,0	38,4	69,0	33,0
Декомпенсированная	864	1800	918	960	910	12,6	72,0	36,0	66,0	32,4

фракциях, она была максимальной в растворимой фракции, почти в 3 раза превышала соответствующие показатели активности фермента ядерной, митохондриальной и лизосомальной фракций. ГЛ расщепляется с наибольшей скоростью растворимой и митохондриальной фракциями. Показано, что фермент лимфоцитов, участвующий в инактивации кининов, по физико-химическим свойствам (оптимум pH, субстратной специфичности) отличается от кининазы лейкоцитов крови и экссудатов и близок к сывороточной карбоксипептидазе N, отщепляющей N-концевой аргинин в молекуле брадикинина и лизин в низкомолекулярном субстрате ГЛ (Erdös, 1971). Кининразрушающий фермент чувствителен к действию ЭДТА, температурному воздействию и влиянию ионов тяжелых металлов Cu^{++}, Zn^{++}, которые при соответствующих концентрациях полностью ингибируют его ферментативную активность, проявляющуюся по отношению к кининам.

Более низкие значения активности кининазы в растворимой фракции лимфоцитов нёбных миндалин определялись у больных с декомпенсированной формой заболевания. В среднем ее активность понижалась на 30% по отношению к субстрату брадикинину и на 20% при использовании ГЛ в сравнении с соответствующими показателями, установленными у больных с субкомпенсированной формой хронического тонзиллита.

Выявленные нарушения активности ферментов протеолиза и кининовой системы в нёбных миндалинах при хроническом тонзиллите можно рассматривать как патогенетические звенья, их следует учитывать при разработке терапии хронического тонзиллита.

Ферменты протеолиза, кининовой системы в крови. Изменения в системе протеолиза в нёбных миндалинах и их структур-

Таблица 16. *Показатели общего протеолиза в сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом до и после тонзиллэктомии* ($M \pm m$)

Форма заболевания	ПРА, нмоль аргинина/(мин·100мл)	БАЭЭ-эстеразная активность, нмоль бензоил-аргинина/(мин·мл)	Общая антипротеолитическая активность, мкг/мл
Субкомпенсированная			
до операции	$6{,}1 \pm 0{,}3$ $P > 0{,}2$	395 ± 37 $P > 0{,}1$	2118 ± 104 $P < 0{,}05$
после операции	$6{,}0 \pm 0{,}3$ $P_1 > 0{,}5$	338 ± 45 $P_1 > 0{,}5$	—
Декомпенсированная			
до операции	$7{,}4 \pm 0{,}5$ $P < 0{,}01$	340 ± 105 —	2177 ± 108 $P < 0{,}02$
после операции	$6{,}7 \pm 0{,}5$ $P_1 > 0{,}2$	420 ± 95 $P_1 > 0{,}2$	—
Здоровые люди	$5{,}7 \pm 0{,}3$	340 ± 10	1812 ± 90

Примечание. P — различие между группами больных и доноров; P_1 — между группами больных до и после операции.

ных компонентах — лимфоцитах при хроническом тонзиллите могут найти отражение в показателях активности энзимов протеолиза крови и других биологических жидкостей.

В связи с этим перспективными представляются исследования ферментов системы общего и специфического протеолиза в периферической крови больных.

К. Н. Веремеенко и соавторы (1973, 1974) исследовали общую протеолитическую активность с использованием субстратов протамина и БАЭЭ, активность кининобразующих и кининустраняющих ферментов, содержание неактивного предшественника кининов — кининогена, а также ингибиторов протеиназ в крови больных с различными формами хронического тонзиллита до и после тонзиллэктомии (табл. 16, 17).

Как видно из табл. 16, уровень общей ПРА в сыворотке крови больных с субкомпенсированной формой заболевания не изменяется, а у больных с декомпенсированной формой тонзиллита значительно повышается. БАЭЭ-эстеразная активность сыворотки крови, характеризующая суммарную активность протеиназ трипсиназного типа, у больных при субкомпенсированной форме заболевания повышается незначительно. Отмечено стати-

Таблица 17. *Изменения компонентов кининовой системы в крови больных хроническим тонзиллитом до и после тонзиллэктомии ($M \pm m$)*

Форма заболевания	Активность калликреина, нмоль бензоил-аргинина/(мин·мл плазмы)	Кининазная активность, нмоль гиппуровой кислоты/(мин·мл плазмы)	Содержание кининогена, мкг/мл сыворотки	Содержание α_2-макроглобулина, мг%
Субкомпенсированная				
до операции	$55 \pm 7{,}8$ $P < 0{,}001$	362 ± 36 $P < 0{,}05$	$2{,}4 \pm 0{,}4$ $P < 0{,}001$	390 ± 23 $P < 0{,}001$
после операции	$38 \pm 4{,}2$ $P_1 < 0{,}05$	330 ± 34 $P_1 > 0{,}5$	$5{,}2 \pm 0{,}7$ $P_1 < 0{,}01$	$374 \pm 5{,}0$ $P_1 < 0{,}001$
Декомпенсированная				
до операции	74 ± 25 $P < 0{,}05$	252 ± 29 $P > 0{,}2$	$2{,}5 \pm 0{,}4$ $P < 0{,}001$	347 ± 53 $P < 0{,}05$
после операции	$53 \pm 3{,}0$ $P_1 > 0{,}2$	298 ± 76 $P_1 > 0{,}5$	$5{,}9 \pm 1{,}1$ $P_1 < 0{,}01$	317 ± 29 $P_1 > 0{,}5$
Здоровые люди	$24 \pm 2{,}0$	290 ± 16	$3{,}5 \pm 0{,}5$	$250 \pm 9{,}0$

Примечание. P — различие между группами больных и доноров; P_1 — между группами больных до и после тонзиллэктомии.

стически достоверное повышение антипротеолитической активности в сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом по сравнению с соответствующими данными у практически здоровых лиц.

При изучении ферментов кининовой системы в крови больных при данной патологии (табл. 17) у обследованных до лечения активность калликреина значительно повышена, в особенности при декомпенсированной форме заболевания. Нарастание активности калликреина сопровождается падением уровня кининогена, что свидетельствует об активации кининовой системы плазмы крови при хроническом тонзиллите.

Известно, что кинины в организме быстро инактивируются благодаря наличию специфических кининустраняющих ферментов — кининаз, определение которых дает ценную информацию о процессах разрушения биополипептидов — кининов. Понижение активности кининазы наблюдалось у больных с декомпенсированной формой заболевания, что, по-видимому, создает условия для накопления в организме больных вазоактивных пептидов и потенцирования их действия.

Для более полной характеристики функциональной активности кининовой системы в условиях хронического тонзиллита важное значение имеют исследования факторов, регулирующих активность кининобразующих ферментов. Особого внимания заслуживает определение ингибиторов фермента, в особенности α_2-МГ. Изучение содержания α_2-МГ (по трипсинсвязывающей способности) показало значительное нарастание его уровня при субкомпенсированной форме заболевания (390 мг% по сравнению с 250 мг% практически здоровых людей). Повышение α_2-МГ можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на выравнивание активности кининобразующих ферментов в крови больных, страдающих хроническим тонзиллитом.

Не менее важное значение имеют исследования компонентов кининовой системы в крови больных в динамике лечения. В ближайшие дни после тонзиллэктомии (5—7-й день) частично нормализуется общая ПРА, активность калликреина и кининазы, а также α_2-МГ, однако выявленные величины не достигают показателей практически здоровых людей. Содержание кининогена после хирургического вмешательства увеличивается, превышая концентрации, характерные для нормы. Активность сывороточной кининазы и α_2-МГ у больных с декомпенсированной формой в ближайшие сроки после операции нормализовалась. Отчетливых изменений со стороны БАЭЭ-эстеразной активности в сыворотке крови после лечения не отмечалось (табл. 16, 17). Через 2—3 мес после тонзиллэктомии в крови больных независимо от клинической формы заболевания нормализовались исследуемые ингредиенты калликреин-кининовой системы (К. Н. Веремеенко и соавт., 1974).

Повышенное образование кининов в крови, а также в миндаликовой ткани больных хроническим тонзиллитом дает основание предполагать, что эти высокоактивные соединения, наряду с другими биологически активными веществами (серотонином, гистамином), могут быть ответственными за клинические проявления, наблюдаемые при данном заболевании,— повышенную сосудистую и тканевую проницаемость, гиперемию, отек, боль и др. Определение кининобразующих и кининустраняющих ферментов, общей ПРА, содержания α_2-МГ может представить интерес с точки зрения дополнительных критериев степени выраженности патологического процесса в нёбных миндалинах и может быть использовано для дифференциальной диагностики различных клинических форм хронического тонзиллита.

Протеолитические ферменты слюны. В состав смешанной слюны кроме секретов околоушной, подчелюстной, подъязычной желез входят слущенный эпителий слизистой оболочки полости

рта, лейкоциты, различные микроорганизмы. В ней содержится свыше 50 ферментов, относящихся к гидролазам, оксидоредуктазам, трансферазам, лиазам, изомеразам (И. Б. Збарский, Л. Ф. Адигамов, 1971; К. Н. Веремеенко и др., 1976; Р. Д. Барабаш, А. П. Левицкий, 1978). Среди ферментов, обнаруживаемых в слюне, наибольшее внимание привлекают протеиназы, участвующие в воспалительных, аллергических и деструктивных реакциях, происходящих в полости рта.

Избрание в качестве объекта исследования слюны больных хроническим тонзиллитом более целесообразно, чем других биологических жидкостей, так как слюнные железы находятся в топографической близости от миндалин, имеют общую иннервацию и гуморально взаимосвязаны. Благодаря повышенной проницаемости тканей миндалин при хроническом тонзиллите из них могут поступать в слюну различные ферменты, в том числе и протеолитические, что может служить индикатором деструктивных процессов воспаленной ткани миндалин. С другой стороны, продукты метаболизма ткани миндалин могут влиять на продуцирование слюнными железами протеиназ.

Определение активности протеолитических ферментов в ротовом секрете затруднено из-за сравнительно низкой их концентрации, сложного характера происхождения смешанной слюны. Обычно применяемые белковые субстраты (казеин, гемоглобин) слабо или совсем не расщепляются протеиназами слюны. Исключение составляет протаминсульфат, который интенсивно гидролизуется протеолитическими ферментами ротового секрета. Это свойство положено в основу разработки количественного метода определения протеолитической активности смешанной слюны и секрета околоушной железы (К. Н. Веремеенко, Л. А. Хоменко, 1973). С помощью этого метода изучена (табл. 18) активность протеиназ слюны, действующих при слабощелочной реакции среды (pH 7,6), у больных хроническим тонзиллитом (К. Н. Веремеенко и др., 1975). У больных при данном заболевании активность протеиназ смешанной слюны значительно повышена по сравнению с таковой практически здоровых людей. При декомпенсированной форме заболевания она более чем в 3 раза превышает нормальные величины. Характер изменений аналогичен при пересчете как на 100 мл слюны, так и на 1 мг белка. В секрете околоушной железы больных ПРА также значительно выше, чем у здоровых (в расчете на 100 мл секрета).

Для идентификации выявляемых в смешанной и паротидной слюне протеиназ изучена их способность расщеплять субстраты БАЭЭ и ГЛ. Показано, что смешанная слюна больных хроническим тонзиллитом обладает более высокой БАЭЭ-эстеразной и

Таблица 18. *ПРА смешанной слюны и секрета околоушной железы у больных хроническим тонзиллитом ($M \pm m$)*

Форма заболевания	Протеолитическая активность, мкмоль аргинина			
	100 мл слюны/ч	1 мг белка/ч	100 мл секрета/ч	1 мг белка/ч
	Смешанная слюна		Секрет околоушной железы	
Субкомпенсированная	143±20,0 P<0,001	0,94±0,17 P<0,01	78±16,5 P<0,01	0,42±0,13 P>0,5
Декомпенсированная	181±28,0 P<0,001	1,2±0,07 P<0,01	46±8,0 P<0,01	0,20±0,03 P>0,2
Здоровые люди	55±8,7	0,43±0,09	16±3,1	0,19±0,04

карбоксипептидазной активностью, чем слюна здоровых людей. Секрет околоушной железы больных интенсивнее гидролизует БАЭЭ, но расщепление ГЛ практически не отличается у больных и здоровых людей. Удельная же карбоксипептидазная активность секрета ниже у больных (табл. 19).

Способность смешанной слюны и секрета околоушной железы расщеплять не только протаминсульфат, но БАЭЭ и ГЛ указывает на присутствие в слюне нескольких протеолитических ферментов с различной специфичностью действия.

Таблица 19. *БАЭЭ-эстеразная и карбоксипептидазная активность слюны и секрета околоушной железы у больных хроническим тонзиллитом ($M \pm m$)*

Форма заболевания	БАЭЭ-эстеразная активность нмоль бензоил-аргинина/мин		Карбоксипептидазная активность, нмоль гиппуровой кислоты/мин	
	Слюна	Секрет околоушной железы	Слюна	Секрет околоушной железы
Субкомпенсированная	44±5,4 / 26±3,6	32±5,0 / 15±1,4	20±5,1 / 11±2,9	18±3,8 / 8,0±1,5
Декомпенсированная	59±6,7 / 36±6,0	27±6,8 / 16±3,7	24±4,2 / 12±4,0	16,0±7,0 / 8,0±4,2
Здоровые люди	34±2,9 / 26±2,1	9,4±1,8 / 12±3,7	6,6±2,3 / 5,4±2,6	16,4±3,4 / 15±3,0

Примечание. Числитель — расчет активности на 1 мл слюны, секрета; знаменатель — удельная активность.

Таблица 20. *Распределение ПРА среди различных фракций слюны у больных хроническим тонзиллитом* ($M \pm m$)

Форма заболевания	Протеолитическая активность, мкмоль аргинина/ч		
	Надосадочная жидкость	Осадок I	Осадок II
Субкомпенсированная	$\frac{87 \pm 17,0}{0,92 \pm 0,22}$	$\frac{147 \pm 30,0}{1,45 \pm 0,14}$	$\frac{16,0 \mp 3,6}{0,60 \pm 0,10}$
Декомпенсированная	$\frac{83 \pm 13,0}{0,69 \pm 0,16}$	$\frac{163 \pm 26,0}{1,2 \pm 0,14}$	$\frac{8,5 \pm 3,3}{0,44 \pm 0,14}$
Здоровые люди	$\frac{45 \pm 7,3}{0,51 \pm 0,06}$	$\frac{59 \pm 13,0}{0,75 \pm 0,18}$	$\frac{7,6 \pm 2,2}{0,51 \pm 0,21}$

Примечание. Числитель — активность в расчете на 100 мл слюны и ее фракций; знаменатель — удельная активность.

Для выяснения вопроса о локализации выявляемых протеиназ в цельной слюне ее центрифугировали при 700, 10 000g и получали осадок I (700g), II (10 000g) и надосадочную жидкость (10 000g). Протеиназы, обладающие ПРА и БАЭЭ-эстеразной активностью, локализовались в жидкой части слюны и осадках (табл. 20). Наибольшая их активность присуща осадку I (700g). Эти результаты указывают на то, что источником ферментов в смешанной слюне могут быть не только слюнные железы, но и лимфоциты нёбных миндалин, лейкоциты, микроорганизмы полости рта.

Отмечено, что ПРА, определяемая в смешанной слюне, была значительно ниже суммы активностей, обнаруживаемых в надосадочной жидкости и осадках (табл. 20, 18). Можно полагать, что это связано с наличием в ротовом секрете ингибиторов протеиназ. Для получения доказательств этого исследована способность смешанной слюны угнетать активность трипсина — одного из протеолитических ферментов, добавляемых экзогенно к слюне. Согласно полученным данным (табл. 21), смешанная и паротидная слюна тормозят активность трипсина. Удельная активность ингибитора была снижена у 60% больных хроническим тонзиллитом. Ингибитор локализован в жидкой части слюны и отсутствовал в осадках. В секрете околоушной железы здоровых людей количество ингибитора составляло 10% такового смешанной слюны, в группе больных оно резко (в 6,7 раза) повышалось, приближаясь к величинам, установленным для цельной слюны. Эти результаты говорят о том, что ингибитор железистого происхождения, т. е. продуцируется околоушными и,

Таблица 21. *Содержание ингибиторов трипсина в слюне здоровых людей и больных хроническим тонзиллитом* ($M \pm m$)

Форма заболевания	Уровень ингибитора, мкг инактивированного трипсина		
	Смешанная слюна.	Надосадочная жидкость	Секрет околоушной железы
Субкомпенсированная	$\frac{13,0 \pm 1,8}{7,4 \pm 0,9}$	$\frac{10,3 \pm 1,6}{9,0 \pm 1,4}$	$\frac{8,8 \pm 1,8}{4,0 \pm 0,7}$
Декомпенсированная	$\frac{10,1 \pm 1,2}{6,6 \pm 1,0}$	$\frac{12,5 \pm 3,4}{12,0 \pm 3,2}$	$\frac{8,7 \pm 2,2}{3,0 \pm 0,7}$
Здоровые люди	$\frac{11,5 \pm 2,2}{8,7 \pm 1,8}$	$\frac{10,4 \pm 0,8}{11,5 \pm 1,9}$	$\frac{1,3 \pm 0,5}{1,2 \pm 0,5}$

Примечание. Числитель — содержание ингибитора/мл слюны (секрета); знаменатель — расчет на 1 мг белка.

возможно, подчелюстными железами. О наличии ингибитора протеиназ в секретах подчелюстных желез свидетельствуют и наши данные: содержание его в норме составляло 8—15 мкг/мг белка секрета.

Механизм активации ферментативных систем протеолиза слюны больных хроническим тонзиллитом может быть различным. Повышение активности протеиназ в смешанной слюне возможно за счет их освобождения из лимфоцитов воспаленной ткани миндалин. Об этом говорят данные об активации протеиназ в ткани миндалин животных с экспериментально вызванным тонзиллитом (А. И. Кизим, О. Ф. Мельников, 1974) и параллелизм между увеличением протеолитической активности в гомогенатах лимфоцитов миндалин, смешанной слюне и сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом (К. Н. Веремеенко, В. М. Лосицкая, Э. Л. Зражва, 1974; Л. И. Волохонская, К. Н. Веремеенко, С. П. Грома, 1976). Нарастание активности протеиназ в слюне может происходить и за счет усиленного их синтеза клетками слюнных желез вследствие раздражения последних продуктами метаболизма воспаленной ткани миндалин.

Усиление суммарного протеолиза в слюне больных хроническим тонзиллитом, по-видимому, обусловлено в значительной степени и повышением активности протеиназ, вырабатываемых микробами, играющими важную роль в генезе заболевания.

Возрастание протеолитической активности слюны больных хроническим тонзиллитом может неблагоприятно влиять на иммунологические системы организма. Секреторный иммуноглобулин А является одним из факторов локальной защиты слизи-

стых оболочек от инфекции (А. Е. Вершигора и др., 1978). Он мешает микробам, в том числе и патогенным, адсорбироваться на слизистых оболочках, блокируя их рецепторы. Препятствуя фиксации бактерий на слизистых оболочках, иммуноглобулин А угнетает их размножение и способствует устранению из организма. Если нарастание протеолиза в смешанной слюне обусловлено в значительной степени ферментами микробного происхождения, то это может служить неблагоприятным фактором, способствующим разрушению секреторных иммуноглобулинов А, защищающих слизистые оболочки от инфекции. Не исключено, что и истинные ферменты слюнных желез также обладают высокой протеолитической активностью по отношению к молекулам секреторного иммуноглобулина А.

Можно предположить, что выявляемые в слюне и секрете околоушной железы протеиназы, функционирующие в слабощелочной среде (pH 7, 6), по специфичности действия близки калликреинам. Об этом свидетельствует тот факт, что протеиназы слюны расщепляют протаминсульфат, БАЭЭ и не гидролизуют БАПНА (К. Н. Веремеенко, Л. А. Хоменко, 1973). Очищенные препараты калликреина расщепляют первые два субстрата. Кроме того, трасилол является ингибитором калликреина (Fujimoto и др., 1973). ПРА и БАЭЭ-эстеразная активность слюны угнетается этим ингибитором.

Способность смешанной слюны и секрета околоушной железы расщеплять ГЛ косвенно указывает на наличие в слюне кининаз, гидролизующих вазоактивные полипептиды — кинины.

Для выявления в слюне и секрете околоушной железы ферментов кининовой системы мы использовали специфические субстраты: для кининобразующих ферментов — кининоген плазмы

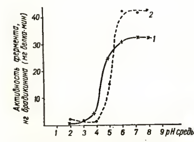


Рис. 2. Зависимость действия калликреиноподобного фермента слюны от pH среды:

1 — смешанная слюна, *2* — секрет околоушной железы.

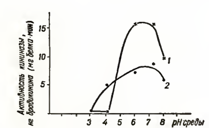


Рис. 3. Влияние pH среды на активность кининазы слюны:

1 — смешанная слюна, *2* — секрет околоушной железы.

Таблица 22. *Распределение кининогеназной и брадикининрасщепляющей активности среди различных фракций слюны* ($M \pm m$)

Объект исследования	Активность калликреина, нг брадикинина/ (мг белка·мин)	Активность кининазы, нг инактивированного брадикинина/(мг белка·мин)
Смешанная слюна	32,0	16,0
Надосадочная жидкость	44,0	18,0
Осадок I	44,0	41,0
Осадок II	117,0	94,0
Секрет околоушной железы	41,0	9,0

Таблица 23. *Активность калликреина и кининазы в слюне больных хроническим тонзиллитом* ($M \pm m$)

Форма заболевания	Активность	
	калликреина, нг брадикинина/ (мг белка·мин)	кининазы, нг брадикинина/ (мг белка·мин)
Субкомпенсированная	54 ± 10 $P < 0{,}1$	$20 \pm 3{,}5$ $P < 0{,}2$
Декомпенсированная	$47 \pm 8{,}5$ $P < 0{,}05$	$25 \pm 4{,}0$ $P < 0{,}05$
Здоровые люди	74 ± 11	$15 \pm 2{,}5$

крови человека, кининустраняющих — брадикинин. Активность калликреина и кининазы ротового секрета определяли биологическим методом. На рис. 2,3 видно, что цельная слюна и секрет околоушной железы содержат ферменты калликреин-кининовой системы с оптимумом их действия при pH 6—7,3.

Калликреин и кининаза локализованы в жидкой части слюны и осадках (табл. 22). Максимальная же удельная активность кининобразующего и кининразрушающего фермента присуща осадку II. Низкий уровень кининазы в секрете околоушной железы по сравнению со смешанной слюной и ее фракциями, вероятно, свидетельствует о том, что бóльшая часть активности кининазы не связана со слюнными железами, а может быть свойственна эпителиальным клеткам (Amundsen, Nustad, 1964). В слюне больных хроническим тонзиллитом активность калликреина понижена, а кининазы повышена по сравнению с аналогичными показателями у здоровых людей (табл. 23).

Понижение активности калликреина, особенно в слюне больных с осложненной формой заболевания, очевидно, связано с функциональным нарушением слюнных желез в ответ на воспалительный процесс в миндалинах. Уровень калликреина значительно падает при патологии слюнных желез (Frey и др., 1968).

Нарастание активности кининазы можно, по-видимому, рассматривать как защитную реакцию, направленную на разрушение вазоактивных пептидов, которые могут образовываться в миндалинах и быть одним из факторов, способствующих повышению сосудистой и тканевой проницаемости миндалин.

Ферменты свертывания крови и фибринолиза

Наиболее распространенный метод лечения хронических тонзиллитов — тонзиллэктомия, на долю которой приходится от 23 до 73% всех хирургических вмешательств на ЛОРорганах (С. А. Ярлыков, Н. П. Брязгунов, 1965; О. М. Гусейнов, 1967, и др.). При этой операции нередко тяжелым осложнением являются глоточные кровотечения, частота которых варьирует от 1 до 24% в зависимости от клинической формы заболевания и других факторов (Л.Н. Халфен, 1967, В. И. Тимошенский, 1970; Б. С. Преображенский, Г. Н. Попова, 1970). В генезе послеоперационных кровотечений большую роль играют сдвиги в ферментативных механизмах, посредством которых осуществляются процессы свертывания крови и фибринолиза.

Для понимания роли различных факторов в нарушении процессов гемостаза при хроническом тонзиллите приведем краткое описание процессов свертывания крови и фибринолиза.

Процесс свертывания крови сложен и многокомпонентен. Условно выделяют внутреннюю и внешнюю систему свертывания крови (Д. М. Зубаиров, 1978). Основным критерием для такого разделения является происхождение фосфолипидов, которые участвуют в образовании активатора протромбина. Во внутренней системе таким источником служат тромбоциты, во внешней — клетки тканей. Свертывание крови по внешнему пути происходит в результате повреждения клеток — эндотелиальных или других, которые при травме оказываются в контакте с вытекающей из сосудов кровью. Освобождение осколков клеточных мембран запускает свертывание крови путем активации VII фактора. Последний активирует фактор X в присутствии фосфолипидов, содержащихся в осколках клеток, и Va фактора. Образующийся фактор Xa катализирует превращение протромбина в тромбин.

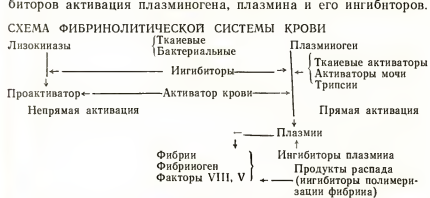


Внутренний путь свертывания крови более сложен, чем внешний. В его основе лежит 5 ферментативных реакций. Процесс свертывания начинается с активации фактора Хагемана (XII фактора свертывания), который при контакте с чужеродной поверхностью превращается в активный фермент XIIa. Последний запускает всю цепь энзиматических реакций, что приводит к образованию тромбина, который катализирует превращение фибриногена в фибрин (схема на с. 50).

Фибрин из фибриногена образуется в результате трех реакций, две из них ферментативные. Тромбин отщепляет от молекулы фибриногена два отрицательно заряженных пептида А и В, при этом образуются молекулы фибрин-мономера. Во второй реакции фибрин-мономер спонтанно полимеризуется, его молекулы соединяются между собой водородными связями. Гель фибрин-полимера закрепляется ковалентными поперечными связями под действием специфического фермента XIII фактора свертывания, что приводит к образованию прочного сгустка фибрина (третья реакция).

В организме человека и животных функционирует и противосвертывающая система, которая включает антитромбины, гепарин, гепариноподобные вещества и компоненты фибринолиза (Г. В. Андреенко, 1979). Фибринолитическая система крови состоит из плазминогена, его проактиваторов и активаторов, ингибиторов активация плазминогена, плазмина и его ингибиторов.

СХЕМА ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ



Активация плазминогена осуществляется прямым и непрямым путем. Прямая активация носит местный (локальный) характер и происходит под действием тканевых активаторов (освобождающихся из поврежденных тканей и сосудов) и активаторов — урокиназы, трипсина, плазмина. К активаторам непрямого действия относятся водорастворимые лизокиназы

тканей, лейкоцитов, эритроцитов и ферменты бактериального происхождения — стрептокиназа, стафилокиназа. Активированный лизокиназами проактиватор превращается в активатор, который током крови разносится по организму и способствует образованию плазмина из плазминогена. Процесс становится общим, генерализованным, при этом активируется вся фибринолитическая система, что наблюдается при шоке после тканевых травм, стрессовых состояниях, стрептококковой инфекции (К. Н. Веремеенко, 1971).

Свертывающая и фибринолитическая системы крови тесно связаны друг с другом, а также с калликреин-кининовой системой. Эта связь проявляется в том, что основные ферменты этих систем (тромбин, плазмин, калликреин), находящиеся в плазме крови в виде неактивных предшественников, активируются при помощи одного и того же механизма XII фактора свертывания крови. Фактор XII катализирует также превращение плазминогена в плазмин прямым путем или через активацию проактиватора. Плазмин, калликреин по принципу обратной связи активирует ФХ (Weiss и соавторы, 1974; Т. С. Пасхина, 1976). В физиологических условиях наиболее важное значение имеет активация ФХ калликреином, так как при недостатке предшественника калликреина — прекалликреина (фактора Флетчера) — наблюдается не только нарушение кининообразования, но и дефекты в свертывании крови и фибринолизе. В организме процессы взаимного активирования ФХ и калликреина осуществляются непрерывно. Калликреин может непосредственно превращать плазминоген в плазмин.

Активность ферментов свертывания, фибринолиза, кининообразования регулируется быстротой действия калликреина на ФХ, фрагментацией молекулы ФХа плазмином и влиянием ингибиторов этих ферментов. К ним относятся CI-инактиватор (ингибитор I компонента комплемента), α_1-антитрипсин, α_2-МГ, антитромбин III и α_2-антиплазмин. α_2-МГ — ингибитор калликреина, плазмина — не инактивирует ферменты полностью, а лишь ограничивает их каталитические функции. В комплексе с этим белком ферменты не расщепляют кининогена, фибриногена, но обладают эстеразной активностью. Основным ингибитором плазмина является α_2-антиплазмин (Kaplan и соавт., 1978).

В норме существует динамическое равновесие между свертывающей, фибринолитической и калликреин-кининовой системами, которое может сдвигаться в сторону угнетения или активации одной из этих систем при патологических состояниях организма.

Проведены многочисленные работы по изучению свертывающей и фибринолитической систем крови, по выяснению роли нёбных миндалин и их функционально активных клеточных структур лимфоцитов в процессах гемостаза у больных хроническим тонзиллитом (С. П. Грома, 1971; В. И. Тимошенский, Н. Н. Юдов, 1972; Л. В. Костюнина, В. П. Скипетров, 1978, и др.). Повышенный интерес ученых к этому вопросу связан с тем, что в возникновении кровотечений после тонзиллэктомии большую роль играет нарушение механизмов свертывающей и противосвертывающей систем крови.

В крови больных при данной патологии отмечена гипокоагуляция (нарушается тромбопластинообразование, наблюдается тромбоцитопения), повышена антикоагулянтная и фибринолитическая активность (Г. А. Даштаянц и др., 1969; Н. К. Гомберг, Т. В. Шабаева, 1975; В. И. Тимошенский, 1976; Л. В. Костюнина, В. П. Скипетров, 1978). При повышении фибринолитической активности белки крови (фибриноген, фибрин) могут подвергаться ферментативному расщеплению с образованием продуктов их распада (ПРФ), что может способствовать возникновению в послеоперационном периоде геморрагий. ПРФ тормозят процесс свертывания крови, удлиняют тромбиновое время, замедляют агрегацию тромбоцитов, тормозят превращение фибриногена в прочные сгустки фибрина. В плазме крови больных хроническим тонзиллитом содержатся ПРФ, причем их уровень выше при декомпенсированной форме заболевания по сравнению с субкомпенсированной (К. Н. Веремеенко и соавт., 1972). Выявлена корреляция между усилением фибринолиза и концентрацией ПРФ.

В генезе ранних послеоперационных кровотечений может играть роль и фермент фибриназа, стабилизирующий сгусток фибрина. Л. И. Волохонская, Г. Э. Темен (1970) отметили параллелизм между повышением фибринолиза и снижением активности фибриназы в плазме крови больных хроническим тонзиллитом. При данной патологии изменяется и уровень ингибиторов фибринолиза в сыворотке крови, при этом возрастает суммарное количество α_1- и α_2-антиплазминов (К. Н. Веремеенко и соавт., 1972). Повышение их содержания, по-видимому, имеет защитный характер и происходит в ответ на ускоренный фибринолиз. Увеличение уровня α_2-МГ может указывать также на усиленный синтез этого белка, что способствует образованию его комплексов с протеиназами, которые гидролизуют низкомолекулярные токсические пептиды, играющие определенную роль в развитии патологического процесса.

Одной из причин нарушения гемостаза у больных хроническим тонзиллитом может быть стрептококковая и стафилококко-

вая инфекция — β-гемолитический стрептококк и стафилококк, продуцирующие ферменты (стрептокиназу и стафилокиназу) — непрямые активаторы фибринолиза. Кроме того, повышение фибринолитической активности крови после удаления миндалин может быть вызвано поступлением из них в кровоток тканевых активаторов плазминогена. Подтверждением этого служат данные о том, что экстракты нёбных миндалин, гомогенаты и субклеточные структуры лимфоцитов ускоряют лизис сгустков фибрина, что указывает на присутствие в них проактиватора, активатора плазминогена, а в отдельных случаях и активного фермента — плазмина (О. Ф. Рыбина, 1973; В. А. Елхов, 1974; Л. В. Костюнина, К. Н. Веремеенко и др., 1978; В. П. Скипетров, 1978). Доказано наличие в миндалинах ингибиторов плазмина (К. Н. Веремеенко и др., 1978; Л. В. Костюнина, В. П. Скипетров, 1978).

Кроме того, в тканях миндалин обнаружены тромбопластин, факторы V, X, XIII. В норме и при простой форме хронического тонзиллита в тканях миндалин существует динамическое равновесие между концентрацией активаторов и ингибиторов плазмина, благодаря чему они равномерно поступают в кровоток, вследствие чего в сосудах операционного поля происходит нормальное образование тромбов и обеспечивается надежный гемостаз. У больных при токсико-аллергической форме заболевания, а также при хроническом тонзиллите, сопряженном с ревматизмом, значительно снижается активность фибриназы, повышается содержание активаторов плазминогена. При данных условиях, вероятно, ускоряется лизис фибриновых сгустков в сосудах операционного поля, а это в свою очередь может сопровождаться ранним послеоперационным кровотечением.

Компоненты свертывающей и фибринолитической системы изучены в слюне. В смешанной слюне обнаружены предшественники ферментов свертывания крови (протромбин, факторы V, VIII, фибриназа) и факторы фибринолиза — проактиватор, активатор плазминогена и плазминоген, ингибиторы плазмина (П. П. Беликов, 1970, 1971; Б. И. Кузник и др., 1976; И. С. Пинелис, 1976; Peclersen, 1976).

В лаборатории биохимии Киевского НИИ отоларингологии проведены исследования по выявлению ряда компонентов фибринолитической системы в слюне и секрете околоушной железы в условиях нормы и у больных хроническим тонзиллитом. С помощью фибриновых чашек (Astrup, Mullertz, 1952) в смешанной слюне ряда больных обнаруживали плазмин, а также плазминоген. Содержание его было выше в смешанной слюне по сравнению с паротидной.

Смешанная слюна и секрет околоушной железы содержат проактиватор плазминогена, активированный стрептокиназой. Комплекс проактиватор — стрептокиназа катализировал превращение плазминогена в активную форму плазмина. Последний определяли по потере способности бычьего фибриногена свертываться под действием тромбина (метод В. А. Белицера и соавт., 1976).

Для более полной характеристики факторов фибринолиза, содержащихся в слюне, изучено наличие в ней ингибиторов, тормозящих активность плазмина. Источником плазмина служила эуглобулиновая фракция, полученная при обработке плазмы каолином в кислой среде (Ogston и др., 1969). Слюна и секрет околоушной железы здоровых людей и больных хроническим тонзиллитом содержали ингибиторы плазмина, о чем свидетельствовало удлинение времени лизиса фибринового сгустка по сравнению с контролем.

Перспективным представляется изучение у больных до и после лечения компонентов фибринолиза, так как от их активности зависит скорость заживления послеоперационных ран, удаление нежизнеспособных клеток, тканей и продуктов их распада.

Окислительно-восстановительные ферменты в нёбных миндалинах и крови при хроническом тонзиллите

Сложные физиологические процессы в миндаликовой ткани протекают при участии метаболических реакций, катализ которых осуществляется многими ферментами и их комплексами.

Систему ферментов клеточного дыхания составляют дегидрогеназы, желтые дыхательные ферменты (флавопротеиды), цитохромы, цитохромоксидазы и ряд других, составляющие основу окислительно-восстановительных процессов в организме и относящиеся к ведущему звену метаболизма. Все ферменты тканевого дыхания — компоненты цепи дыхательных катализаторов — связаны главным образом с внутренними мембранами митохондрий. Важной функцией этой группы ферментов, наряду с дегидрированием различных субстратов дыхания и переброской электрона на кислород с образованием воды, является аккумуляция значительной части энергии в фосфатных связях высокоэргических (или макроэргических) соединений, главным образом аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ).

Особый интерес в клинической практике представляют те окислительно-восстановительные ферменты, которые участвуют

в ключевых звеньях окисления промежуточных продуктов энергетических веществ — углеводов, жиров, белков.

Оксидоредуктазы тонзилл. Имеется ряд публикаций, посвященных изучению активности ферментов тканевого дыхания в миндаликовой ткаии при хроническом тонзиллите (Н. А. Московченко, 1970; Л. Ф. Подойницыной, 1970; В. С. Жданова, 1971; И. Б. Солдатова, 1972; Н. А. Антоновой, 1973; М. А. Онановой, К. С. Чиковани, 1974; Soboczynski и соавт., 1974, и др). С помощью гистохимических и биохимических методов исследования показано ие только наличие и распределение сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) и цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) в структурных компонентах тканей иёбних миндалин, ио и изменение их ферментативной активности в зависимости от возраста, выраженности патологического процесса, метатонзиллярных осложнений и сопутствующих заболеваний.

В. С. Ждаиов (1971) с помощью биохимических и гистохимических тестов установил, что при простой форме хронического тонзиллита, сопровождающейся рецидивирующими ангиями в анамнезе, уровеиь сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦО) в миндаликовой ткаии был высоким и соответствовал показателям, выявленным в гипертрофированных тонзиллах. При усилении патологического процесса активность этих ферментов падает, что свидетельствует об угнетении окислительиых и восстановительных процессов в нёбных миндалииах. Наиболее значительные изменения активности исследуемых ферментов характерны для больных хроническим тонзиллитом с рецидивирующими паратонзиллитами и паратоизиллярными абсцессами и выраженной тонзиллогенной интоксикацией. При таких условиях может возникнуть дефицит в этой биокаталической системе, о чем косвено свидетельствует резкое падение СДГ и ЦО в патологически измененных иёбных миндалинах. В результате этих иарушений в нёбиых миидалинах происходит накопление продуктов промежуточного обмена с преобладанием недоокисленных соедииений, что приводит к изменению pH среды тканей в сторону ее подкисления. При этом развивается тканевая гипоксия, обиаруживаются изменения в очаге воспаления вначале функционального характера, которые впоследствие становятся иеобратимыми. Если нарушенные звенья метаболизма, связаиные с аэробной фазой тканевого дыхания, в нёбных миндалинах не компенсируются анаэробными процессами, то это, по мнению В. С. Жданова (1976), приводит к необратимости воспалительной реакции, реализации многочисленных воздействий очага гиойной инфекции на организм в целом — развитию сопряжениых заболеваний и декомпенсации хронического тонзиллита. При норма-

лизации обмена в цепи ферментов тканевого дыхания за счет анаэробной фазы могут функционировать механизмы компенсации. Следовательно, гипоксическое состояние тканей нёбных миндалин, дезорганизация процессов метаболизма проходят через стадию компенсации к явлениям декомпенсации.

Н. А. Антонова (1973) с помощью гистохимических методов в нёбных миндалинах больных хроническим тонзиллитом и тонзиллитом, сопряженным с коллагеновыми заболеваниями, изучила ферменты аэробного окисления углеводов (дегидрогеназа яблочной кислоты, изолимонной и глутаминовой кислоты), энзимы анаэробного гликолиза (дегидрогеназа молочной кислоты, β-глицерофосфата), ферменты пентозного цикла (дегидрогеназа глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата), участвующие в синтезе пентозонуклеопротеидов, идущих на построение нуклеиновых кислот. В обеих группах больных не найдено существенных различий в активности исследуемых ферментов за исключением дегидрогеназы молочной кислоты, активность которой значительно выше в миндаликовой ткани больных хроническим тонзиллитом, сопряженным с коллагеновыми заболеваниями (системная красная волчанка, склеродермия, дерматомикозы). Установленный факт, вероятно, свидетельствует о преобладании в тонзиллах этих больных процессов анаэробного гликолиза.

В выяснении роли окислительно-восстановительных ферментов в иммунном ответе может представить интерес изучение этой группы ферментов в функционально активных клетках тонзилл—лимфоцитах. Д. П. Панавене и соавторы (1973) обнаружили малатдегидрогеназу (МДГ) в популяции лимфоцитов, выделенной из нёбных миндалин. Уровень активности фермента зависел от сопряженных заболеваний и возраста больных: у взрослых больных хроническим тонзиллитом он был равен $0,432 \pm 0,09$ ед. Бюджета, что несколько ниже (в среднем на 16%), чем у детей ($0,502 \pm 0,087$ ед.), и почти в 2 раза выше ($0,860 \pm 0,20$ ед., $P < 0,05$), чем у больных ревматизмом.

Имеются также работы, указывающие на изменение активности СД в лимфоцитах нёбных миндалин при их патологии (Н. А. Московченко, 1970). Активность СД в отдельных лимфоцитах ткани миндалин повышается по мере развития заболевания и появления осложнений. В лимфоцитах периферической крови уровень СД невысок и зависит от клинической формы хронического тонзиллита.

Ряд авторов (Б. В. Еланцев, С. Е. Тайбогаров, 1970; В. С. Жданов, 1971) указывают на возможную зависимость активности ферментов тканевого дыхания от возраста больных.

Активность ЦО в нёбных миидалинах, удаленных у детей, значительно иижe, чем у взрослых, а активность СД настолько низка, что в отдельных случаях вовсе не выявляется. Возможно, эта особенность ферментов тканевого дыхания связана с состоянием общей реактивности детского организма.

Известио, что многие кофакторы окислительио-восстановительных ферментов представлены витаминами группы В. Поэтому при дефиците витаминов изменяется активность соответствующих ферментных систем. В. С. Ждаиов (1971) показал, что у больных хроническим тонзиллитом, получавших до операции комплекс витаминов B_1, B_2, B_6 и PP, активность СДГ и ЦО более высокая, иежели в группе больных, не получавших витаминные препараты. Эти данные позволили рассматривать витамины группы В как стимуляторы окислительно-восстановительиых реакций в иёбных миндалинах и использовать их не только с профилактической целью, ио и в комплексиом лечении больных с хроническим тонзиллитом.

Следовательно, процессы окисления в тканях нёбных миндалии ослабляются в зависимости от степени выраженности патологического процесса, что может сопровождаться нарушениями клеточиого метаболизма и ресинтеза макроэргических фосфорных соединений.

Оксидоредуктазы крови. Длительная тоизиллогенная интоксикация, воздействие инфекциоиного агента иа миндалины значительно сиижает иммунологические свойства организма, что в значительной мере влияет на метаболические процессы, катализируемые оксидоредуктазами, ие только в нёбных миидалинах, ио и в периферической крови.

По данным Л. Я. Тамм, И. П. Брязгунова (1969), Л. И. Веримеевича (1972) и др., у большинства обследованных детей, больных хроническим тонзиллитом, обнаружено повышеиие активности сывороточной ЛДГ, особеиио при токсико-аллергической форме заболевания. После оперативиого удаления очага воспалеиия или эффективного коисервативного лечеиия общая активность ЛДГ в сыворотке крови больиых хроническим тонзиллитом нормализуется, в то время как у больных с латентио текущим ревматизмом ее показатели остаются значительно повышенными.

Согласно данным литературы, в сыворотке крови здорового человека содержится пять изоферментов ЛДГ, при повреждении того или иного органа оии могут изменяться соответствеиио специфике изоферментиого состава поврежденного органа.

Л. Я. Тамм, И. П. Брязгуиов (1969) приводят данные активности изоферментного спектра ЛДГ в сыворотке крови больиых

детей с токсико-аллергической формой хронического тонзиллита. В одной группе больных в сыворотке крови повышалась активность изоферментов $ЛДГ_5$ и $ЛДГ_4$, т. е. фракций с высокой электрофоретической подвижностью, характерных для печеночной ткани, в другой — наблюдались изменения в уровне активности изофермента $ЛДГ_1$, присущего сердечной мышце. После консервативного лечения со значительным улучшением клинического состояния больных отмечена положительная динамика изоферментного спектра $ЛДГ_1$, $ЛДГ_2$ и $ЛДГ_5$, показатели которого практически нормализовались к концу лечения. По данным Л. И. Веримеевича (1972), при токсико-аллергической форме заболевания сохраняется нормальный изоферментный спектр сывороточной $ЛДГ_1$, в то время как при латентно текущем ревматическом процессе наблюдаются выраженные сдвиги в его активности.

Следовательно, определение активности ЛДГ в сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом можно использовать как дополнительный диагностический тест, а исследование изоферментов ЛДГ — для суждения о степени выраженности патологического процесса, выявления ранних метатонзиллярных осложнений со стороны сердца и печени и контроля за эффективностью проводимых лечебных мероприятий.

Со стороны изоферментов МДГ отчетливых изменений в сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом не выявлено (С. И. Буребаева, Е. С. Нургужаев, 1976).

В последние годы начали появляться сообщения об изучении оксидоредуктаз в клеточных элементах периферической крови. Заслуживают внимания исследования Г. Х. Дадахановой, Ш. А. Аскарова (1971), показавших значительное нарастание активности пероксидазы в нейтрофилах крови при усугублении патологического процесса в нёбных миндалинах. Показано, что степень нормализации активности фермента зависит от метода лечения. Тонзиллэктомия оказывала более благоприятный эффект на нормализацию активности пероксидазы, нежели консервативное лечение. Поэтому авторы считают, что определение активности пероксидазы может быть включено в арсенал методических приемов лабораторной диагностики хронических тонзиллитов с целью выявления нейротонзиллярных осложнений, а также для суждения об эффективности терапии.

Имеющиеся сведения позволяют заключить, что наблюдаемые сдвиги в окислительно-восстановительных процессах можно рассматривать как важнейшее патогенетическое звено хронического тонзиллита.

Гиалуронидаза-антигиалуронидаза в нёбных миндалинах и крови при хроническом тонзиллите

К. Г. Шукурян (1962), З. И. Кашеварова (1973), А. А. Лапа (1973) изучили активность гиалуронидазы и антигиалуронидазы в тканевых экстрактах нёбных миндалин и крови у больных хроническим тонзиллитом. Об активности фермента судили по уменьшению вязкости гиалуроновой кислоты, инкубированной с экстрактами миндаликовой ткани или сывороткой крови. Исследования, проведенные на большом клиническом материале (60 больных), показали, что активность гиалуронидазы значительно выше в экстрактах нёбных миндалин у больных с различными формами хронического тонзиллита, чем в экстрактах, полученных из гипертрофированных тонзилл (К. Г. Шукурян, 1970, 1972). Активность гиалуронидазы в экстрактах миндаликовой ткани в детском и юношеском возрасте выше, чем у больных старше 25 лет. Понижение активности фермента в связи с возрастом можно объяснить наступлением более выраженных фиброзных изменений и разрастанием соединительной ткани в тонзиллах и стенках сосудов, а также накоплением кислых мукополисахаридов у лиц старшего возраста (Н. Д. Вартазарян, 1974). Высказано предположение, что гиалуронидаза участвует в механизме ослабления гисто-гематологического барьера миндалин детей в условиях патологии, что создает условия для обострения хронического тонзиллита и развития метатонзиллярных осложнений.

Гиалуронидазная активность нёбных миндалин в определенной степени зависит также от частоты обострений и давности заболеваний. К. Г. Шукурян (1966) отметил, что из 24 больных, страдающих хроническим тонзиллитом в течение 3 лет, активность гиалуронидазы оказалась несколько повышенной у 12 человек, у 10 — умеренной и только у 2 больных — значительно увеличенной. У 36 больных хроническим тонзиллитом с давностью заболевания 5—8 лет и более активность гиалуронидазы была в основном умеренной и значительно повышенной по сравнению с показателями в контрольной группе.

Из 60 обследованных больных почти у половины при повышенной гиалуронидазной активности СОЭ ускорялась в пределах от 17 до 30 мм/ч и отмечался умеренный лейкоцитоз. Оценивая эти данные, можно высказать предположение, что ускорение СОЭ может зависеть от активности гиалуронидазы. По мере отягощения патологического процесса наблюдается активация системы гиалуронидаза—антигиалуронидаза, что способствует

ускорению всасывания токсинов и патогенных агентов в ткани организма из лакун миндалин через кровеносные сосуды в лимфатическую систему. Можно полагать, что в этом процессе, наряду с тканевой гиалуронидазой, может также принимать участие и фермент микробного происхождения. Для подтверждения этого предположения К. Г. Шукурян (1966) изучил активность гиалуронидазы в различных штаммах гемолитического стрептококка, выделенных из глубины крипт и поверхности миндалин. Большинство штаммов стрептококка, полученных из различных участков нёбных миндалин, обладают способностью расщеплять гиалуроновую кислоту, что доказывает наличие в миндаликовой ткани гиалуронидазы и микробного происхождения.

Каков же механизм участия гиалуронидазы в повышении проницаемости тканевых структур нёбных миндалин? С помощью гистохимических и гистоморфологических методов было установлено, что в условиях хронического тонзиллита в результате активации гиалуронидазы тканевого и микробного происхождения усиливается процесс деполимеризации гиалуроновой кислоты — основного вещества соединительной ткани. В связи с этим создаются условия для усиления проницаемости тканей и сосудов в очаге воспаления, что, по-видимому, значительно ослабляет гисто-гематологический барьер нёбных миндалин. В результате таких нарушений токсины микробов, микробные тела, аллергены могут значительно быстрее и в бóльших концентрациях поступать в кровеносное русло и вызывать интоксикацию, аллергизацию организма и развитие сопряженного с хроническим тонзиллитом заболевания.

В последние годы опубликованы работы по исследованию компонентов системы гиалуронизада — антигиалуронидаза в крови больных хроническим тонзиллитом. З. А. Кашеварова (1973) указывает, что в сыворотке крови больных при компенсированной форме тонзиллита наблюдается небольшое повышение активности гиалуронидазы (34—45%), появление гиалуроновой кислоты (0,5—3,0 мкг/мл) при нормальном показателе антигиалуронидазы (27%). Более существенное нарастание активности гиалуронидазы (38—55%) и снижение активности антигиалуронидазы было характерно для больных с субкомпенсированной формой заболевания, в анамнезе которых наблюдались периодические ангины, выраженные местные признаки хронического воспаления. У больных с декомпенсированной формой заболевания отмечено существенное повышение активности гиалуронидазы (40—80%) при понижении антигиалуронидазы (8—22%) и увеличении концентрации гиалуроновой кислоты (27—35 мкг/мл).

Аналогичная направленность изменений в показателях компонентов системы гиалуронидаза—антигиалуронидаза в крови больных хроническим тонзиллитом отмечена в работах И. П. Данилова (1962), А. А. Лапы (1973) и др.

После тонзиллэктомии нормализация показателей системы гиалуронидаза — антигиалуронидаза в крови больных хроническим тонзиллитом наступала в различные сроки: при субкомпенсированной форме заболевания — на 5—7-й день, а при декомпенсированной форме — только спустя 5—6 мес.

Следовательно, при хроническом тонзиллите наблюдаются изменения в системе гиалуронидаза — антигиалуронидаза, компоненты которой наряду с другими биологически активными соединениями, в частности вазоактивными полипептидами, некоторыми лизосомальными ферментами, катионными белками, играют важную роль в механизмах регуляции сосудистой и тканевой проницаемости.

Лизоцим

Из ферментов, играющих одну из ведущих ролей в естественном неспецифическом иммунитете, следует назвать лизоцим (мурамидаза, КФ 3.2.1.17). В организме он содержится в слизистых оболочках дыхательных путей, полости рта, конъюнктиве глаз, т. е. в тех тканях, на которые постоянно воздействуют микроорганизмы, а также в сыворотке крови, плевральной жидкости, дуоденальном соке (О. В. Бухарин, Н. В. Васильев, 1974). Лизоцим обнаружен и в слюнных железах и в их секретах. Из секрета околоушной железы препарат лизоцима выделен в очищенном виде, изучены его физико-химические свойства и аминокислотный состав.

Концентрация ферментов лизоцима в секрете околоушной железы составляет 0,5 мг/100 мл. В смешанной слюне лизоцима содержится значительно больше, чем в сыворотке крови и различных тканях (К. Н. Веремеенко и др., 1976; Р. Д. Барабаш, А. П. Левицкий, 1978).

Биологическая роль лизоцима не ограничивается только антибактериальным действием, он принимает участие в защитных, иммунных реакциях организма, в процессах регенерации и заживлении ран полости рта.

Содержание лизоцима в сыворотке крови и слюне у больных хроническим тонзиллитом ниже, чем у здоровых людей. Наиболее значительное снижение уровня лизоцима в сыворотке и слюне наблюдали у больных с токсико-аллергической формой тонзиллита (А. В. Брофман и др., 1972; З. С. Шаихов, Б. З. Жусупов,

1977). Лизоцим был выявлен и в гомогенатах нёбных миндалин (И. А. Аникин, Б. А. Фролов, 1973).

Изучено содержание лизоцима в сыворотке крови и слюне больных после тонзиллэктомии. Установлено, что уровень фермента в обеих биологических жидкостях нормализовался в различные сроки после операции в зависимости от клинической формы заболевания — от 6 дней до нескольких недель (А. В. Брофман и др., 1972; З. С. Шаихов, Б. З. Жусупов, 1977). Снижение лизоцима в сыворотке крови и особенно в слюне может служить показателем хронической инфекции в ротовой полости. Более значительное снижение содержания лизоцима в слюне больных при токсико-аллергической форме заболевания по сравнению с простой можно использовать в качестве дополнительного теста дифференциальной диагностики хронического тонзиллита. Низкое содержание лизоцима до операции в слюне и сыворотке и повышение его после оперативного вмешательства является показателем эффективности проведенной тонзиллэктомии.

Следовательно, при хроническом тонзиллите наблюдаются изменения в обмене веществ, о чем свидетельствуют сдвиги в уровне активности протеолитических ферментов с общим и в особенности с ограниченным спектром действия, энзимов окислительно-восстановительных процессов, системы свертывания крови и фибринолиза, гиалуронидазы, лизоцима как в тканях патологически измененных нёбных миндалин и их функционально активных структурных компонентах — лимфоцитах, так и в периферической крови и секретах слюнных желез.

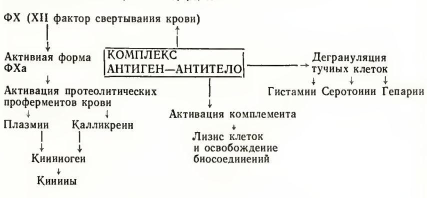
Обнаруженные изменения в отдельных энзиматических системах могут рассматриваться как важнейшие патогенетические звенья хронического тонзиллита, а определение протеолитических ферментов и их ингибиторов в крови и секретах слюнных желез может быть использовано для диагностики, выявления метатонзиллярных осложнений, а также оценки эффективности терапевтических мероприятий.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

В последние годы увеличивается частота аллергических заболеваний верхних дыхательных путей (Н. В. Ванюков, 1978),

В механизме развития аллергических реакций различают три стадии (А. Д. Адо, 1976): иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую. Иммунологическая стадия начинается

СХЕМА ОБРАЗОВАНИЯ БИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ



(повышение проницаемости капилляров, отек слизистой оболочки, эмиграция лейкоцитов, бронхоспазм)

при первом контакте организма с аллергеном и заканчивается образованием комплекса антиген — антитело, что вызывает изменения в биохимизме клеток.

При патохимической (биохимической) стадии вследствие активации ряда гидролитических ферментов освобождаются медиаторы (см. схему на с. 64). Образовавшийся комплекс антиген—антитело вначале активирует систему комплемента, что приводит к лизису клеток и освобождению биологически активных соединений. Комплекс антиген — антитело активирует также протеолитические ферменты крови и в первую очередь XII фактор свертывания крови (ФХ), активная форма которого (XIIa) катализирует превращение плазминогена и прекалликреина соответственно в плазмин и калликреин, которые освобождают кинины из кининогена. Повышается содержание простагландинов, поскольку кинины способствуют их синтезу (Ferragno, 1972). Комплекс антиген — антитело вызывает дегрануляцию тучных клеток соединительной ткани, которые выделяют медиаторы аллергических реакций — гистамин, серотонин, гепарин. Так возникают реакции немедленного типа.

При аллергических реакциях замедленного типа происходит контакт лимфоцитов с аллергеном. Активированный антигеном Т-лимфоцит выделяет ряд биоактивных соединений — лимфокинов, которые проявляют высокую активность и воздействуют на иммунокомпетентные клетки и ткани (А. Е. Вершигора, 1975;

De Weck, 1975). Распад лейкоцитов благоприятствует выделению из лизосом различных ферментов, разрушающих белки, углеводы, липиды и др.

Существенной особенностью течения биохимической фазы аллергической реакции является быстрое нарастание процесса, связанное с каскадным механизмом образования биологически активных соединений.

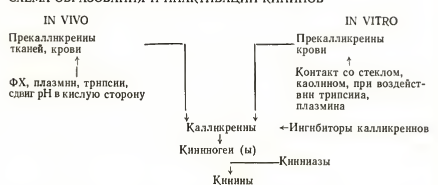
Патофизиологическая стадия (или стадия функциональных и структурных изменений) аллергической реакции наступает в результате действия биологически активных соединений, освобождающихся в организме при патохимической стадии аллергического процесса. При этом возникают функциональные и структурные нарушения. Освободившийся гистамин вызывает отек, зуд, эритему, сокращение гладкой мускулатуры, спазм бронхов, снижение артериального давления.

В биохимической стадии аллергической реакции существенную роль играют протеиназы, проявляющие свою активность как прямым, так и косвенным образом. Они способны вызывать сокращение гладкой мускулатуры. Iravani и соавторы (1977) изучали в опытах in vitro действие трипсина, химотрипсина и фицина на диаметр просвета бронхов на изолированном трахео-бронхиальном дереве крыс и показали, что все три фермента вызывали сужение просвета бронхов. Использование трасилола (ингибитора протеиназ) полностью блокировало действие трипсина и химотрипсина.

Фибринолитическая активность плазмы у больных бронхиальной астмой была значительно выше, чем в контрольной группе, что свидетельствует об участии ферментов протеолиза, в частности фибринолиза, в патогенезе аллергии (Chyrek-Borowska и соавторы, 1969).

М. С. Суровикина (1971), Chyrek-Borowska и соавторы (1973), Rostworowska (1974) полагают, что решающую роль в освобождении гистамина в результате нарушения связывающих его внутриклеточных структур играют протеолитические ферменты. Это положение подтверждено в ряде экспериментальных работ. В опытах на морских свинках установлено, что внутрикожное введение бактериального протеолитического фермента субтилизина в течение 3 нед повышает концентрацию гистамина в печени и ткани уха (Tolos и соавторы, 1975). Sasaki (1975) в опытах in vitro показал, что обработка изолированных тучных клеток крыс α-химотрипсином способствует высвобождению из них гистамина. Доказательства этого получены в исследованиях, в которых α-химотрипсин выдерживался со специфическим ингибитором: потеря энзиматической активности сопровождалась

СХЕМА ОБРАЗОВАНИЯ И ИНАКТИВАЦИИ КИНИНОВ



исчезновением способности фермента стимулировать освобождение гистамина.

Особым свойством ферментов протеолиза является их способность катализировать образование и распад кининов — медиаторов аллергических реакций. Они образуются в крови, тканях и межтканевой жидкости во всех органах человека и животных (М. С. Суровикина, 1971; К. Н. Веремеенко, 1977; Eisen, 1969). Кинины, аналогично гистамину и серотонину, но в количествах в десятки раз меньших, повышают проницаемость тканей, вызывают отек, усиливают эмиграцию лейкоцитов и хемотаксис.

В организме кинины образуются при участии сложных систем протеолитических ферментов, активаторов и ингибиторов (см. схему на с. 66).

Кинины в незначительном количестве действуют на тонус кровеносных сосудов и гладкой мускулатуры, проницаемость клеточных мембран, стимулируют деятельность сердца, усиливают потребление кислорода в миокарде, участвуют в развитии воспалительной и аллергической реакции.

На органы дыхания кинины оказывают специфическое действие, влияя на гемодинамику малого круга кровообращения и гладкие мышцы трахео-бронхиального дерева (М. С. Суровикина и соавт., 1972). Обнаружено бронхоконстрикторное действие кининов, механизм которого еще не известен. Предполагают как прямое влияние этих пептидов на гладкие мышцы бронхов, так и опосредованное путем возбуждения специальных рецепторов, локализованных в гладких мышцах или слизистой оболочке бронхов. Сенсибилизированные животные и люди, больные аллергическими заболеваниями, особенно чувствительны к брон-

хоконстрикторному влиянию брадикинина, который тормозит функцию мерцательного эпителия.

Н. А. Федосеева, Н. В. Беляков (1971), А. Д. Адо (1976), Аве и соавторы (1967), Lukjan и соавторы (1972) указывают на роль кининов в патогенезе аллергических заболеваний. Особый интерес представляют исследования компонентов кининовой системы при аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей, в частности при аллергических ринитах. Аллергические риниты — это хронические заболевания, которые в зависимости от длительности течения делятся на две группы: 1) острые, или сезонные, связанные со временем цветения определенных растений, и 2) постоянные, когда человек непрерывно контактирует со специфическими раздражителями, к которым имеется извращенная чувствительность.

К. Н. Веремеенко и соавторы (1974) исследовали активность протеолитических ферментов и компонентов кининовой системы в общем кровотоке 42 больных, страдавших аллергическими ринитами от 6 мес до 15 лет. У больных с хроническими инфекционно-аллергическими риносинуитами сенсибилизация организма, выявляемая по данным кожных проб, была вызвана в основном антигенами стафилококка (белого и золотистого) и β-гемолитического стрептококка; у лиц с острыми сезонными заболеваниями (поллинозами) — пыльцой трав: тимофеевки, ежи, овсяницы, лисохвоста, райграса, костра и лебеды в различном их сочетании.

У больных хроническими инфекционно-аллергическими ринитами общая протеолитическая активность сыворотки крови, выявляемая по расщеплению протамина, была достоверно повышена, БАЭЭ-эстеразная активность не изменена (табл. 24). Содержание ингибиторов протеолиза — α_2-МГ и общая антипротеолитическая активность в этой группе больных и у больных поллинозом в остром периоде заболевания повышались, что можно трактовать как защитную реакцию организма в ответ на активацию протеолиза.

У больных инфекционно-аллергическим ринитом и поллинозом в стадии обострения наблюдаются отчетливые изменения в показателях кининовой системы плазмы крови. Активность кининобразующего фермента в среднем повышена в 2,3 раза. Она значительно возрастает у больных с длительным, упорным течением, с резко выраженной сенсибилизацией организма (положительные кожные пробы на антигены стафилококка и стрептококка, повышенное количество эозинофилов в крови и носовом секрете), а также при наличии у них очагов хронической инфекции, чаще всего хронического тонзиллита. Активность кининобра-

Т а б л и ц а 24. *Активность ферментов протеолиза и кининовой системы в плазме крови больных хроническим риносинуитом* ($M \pm m$)

Обследуемые	Количество больных	Протамин-расщепляющая активность, мкмоль антинина/100 мл	БАЭЭ-эстеразная активность нмоль БА/(мин.мл)	α_2—макроглобулин, мг%	Общая антитриптическая активность, мкг/мл	Калликреин: БАЭЭ-эстеразная, активность, нмоль БА/(мин. мл)	Калликреин: в % от общей БАЭЭ-эстеразной активности	Кининоген, мкг брадикинина/мл	Активность кининазы, нмоль ГЛ/(мин. мл)
Больные хроническим инфекционно-аллергическим ринитом	15	6,7±0,3 P<0,05	331±39 P>0,5	294±13 P<0,02	2245±97 P<0,05	55±7,0 P<0,001	22±4,0 P<0,01	2,1±0,27 P<0,2	316±31 P>0,2
Больные поллинозом:									
острый период	16	5,8±0,4 P>0,5	366±46 P>0,5	300±2,5 P>0,1	2420±95 P<0,01	43±7,6 P<0,02	18±2,6 P<0,001	2,1±0,23 P<0,02	244±23 P>0,1
состояние ремиссии	16	6,5±0,5 P>0,1	326±33 P>0,5	280±18 P>0,1	1671±80 P>0,5	33±3,2 P<0,05	11±2,2 P=0,05	3,6±1,0 P>0,5	285±20 P>0,5
Доноры	15	5,7±0,3	340±10	250±9	1800±90	24±2	7,4±0,5	3,5±0,5	290∓16

зующего фермента у больных поллинозом зависит от периода заболевания: на высоте острого приступа она выше, чем при его стихании (когда сезон цветения трав, к пыльце которых повышена чувствительность, был на исходе).

Содержание кининогена (предшественника кининов) у больных обеих групп достоверно снижено, что может быть показателем его превращения в активный кинин. Активность карбоксипептидазы N (кининазы) в сыворотке крови несколько изменяется, но статистически недостоверно.

Таким образом, активация протеиназ и кининовой системы плазмы крови, возможно, является одним из факторов, ответственным за клинические признаки заболевания — гиперемию слизистой оболочки, резкий ее отек, усиленный процесс экссудации и др. У больных инфекционно-аллергическим хроническим риносинуитом, по сравнению с больными поллинозами, выявлены нарушения более глубокого характера, проявляющиеся в изме-

нении всех исследуемых ингредиентов кининоген-кининовой системы. По-видимому, это результат хронического течения заболевания, длительности контакта организма больного с аллергеном, а также наличия микробного компонента воспаления. У больных поллинозами изменения основных компонентов наблюдаются лишь в остром периоде заболевания. Состояние ремиссии характеризуется нормальными показателями большинства исследуемых ингредиентов.

Исключение составляет калликреин, активность которого остается в 1,3 раз выше, чем в норме, что может свидетельствовать о состоянии «повышенной» готовности организма больного к рецидиву заболевания при новом контакте с «причинным» аллергеном.

При аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей исследована также активность протеиназ в лейкоцитах крови (К. Н. Веремеенко и соавт., 1978). Суспензия и гомогенаты лейкоцитов содержали протеолитические ферменты, функционирующие как в кислой (рН 3,5, субстрат гемоглобин), так и в нейтральной среде (рН 7,5—8,6, субстраты казеин, протамин, БАЭЭ и ТАМЭ). Обследованы две группы больных: с хроническим инфекционно-аллергическим риносинуитом и с острыми заболеваниями — поллинозами в стадии обострения процесса и ремиссии. Диагноз аллергической ринопатии ставился на основе генопатической семейной отягощенности, пароксизмального характера профузной секреции с секреторной эозинофилией, положительных кожных проб с микробными и пыльцевыми аллергенами. В затруднительных для диагностики случаях проводились провокационные назальные пробы с предполагаемыми «виновными» аллергенами. У больных наблюдались изменения, зависящие от формы заболевания и объекта исследования (табл. 25). При инфекционно-аллергическом рините в суспензии лейкоцитов снижалась ПРА. Такая же закономерность отмечена в гомогенатах лейкоцитов и суспензии у больных поллинозом в остром периоде.

У больных с хронической формой заболевания — инфекционно-аллергическими ринитами — изучено распределение протаминрасщепляющей активности в различных субклеточных фракциях лейкоцитов, полученных методом дифференциального центрифугирования (табл. 26).

Все субклеточные фракции лейкоцитов, за исключением растворимой цитоплазматической, у доноров и больных хроническим инфекционно-аллергическим ринитом способны расщеплять белковый субстрат протамин. В большей степени это присуще протеазам лизосом и микросом и в меньшей мере — энзимам ядер.

Таблица 25. *Активность нейтральных протеиназ лейкоцитов у больных аллергическими ринитами*

Обследуемые	Активность, нмоль аргинина/(мин·мг белка)			
	суспензия		гомогенат	
	M±m	P	M±m	P
Больные хроническим инфекционно-аллергическим риносинуитом	2,4±0,22	<0,001	12,6±1,25	>0,5
Больные поллинозами:				
острый период	3,0±0,30	<0,01	8,6∓0,92	<0,05
состояние ремиссии	3,5±0,52	> 0,5	15,0±2,41	>0,5
Доноры	4,3±0,36	—	13,2±1,80	—

Таблица 26. *Протеолитическая активность в субклеточных фракциях лейкоцитов*

Фракции	Активность, нмоль аргинина/(мин. мг белка)		
	Доноры M±m	Больные M±m	P
Ядерная	9,6±2,3	7,0±1,80	>0,5
Митохондриальная	15,5±2,8	8,4±1,40	<0,05
Лизосомальная	26,8±5,0	11,7±1,67	<0,05
Микросомальная	25,0±5,5	18,3±2,40	<0,2
Растворимая	1,4±0,6	0	—
Гомогенат	13,1±1,5	12,5±1,10	>0,5

Отсутствие ПРА в растворимой фракции дает возможность предположить наличие в ней ингибиторов протеиназ. В лизосомальной и митохондриальной фракциях активность ферментов у больных значительно ниже, чем у здоровых людей.

В гомогенатах лейкоцитов у больных хроническим инфекционно-аллергическим ринитом и больных поллинозами в состоянии обострения активность катепсинов (рН 3,5) значительно снижена и составляет соответственно 0,14 мкмоль и 0,13 мкмоль по сравнению с этими показателями у доноров (0,27 мкмоль/(мин. мг).

Среди ферментов лейкоцитов особый интерес представляют энзимы кининовой системы, являющиеся важным звеном в гу-

Таблица 27. *Кининогеназная активность гомогенатов лейкоцитов в кислой и слабощелочной среде*

Обследуемые	Активность кининогеназ, нг брадикинина/(мг белка·ч) при			
	pH 2,5		pH 7,6	
	M±m	P	M±m	P
Больные хроническим инфекционно-аллергическим ринитом	136,0±31,0	<0,01	142±38	>0,1
Больные поллинозом:				
ремиссия	72,0±23	<0,05	147±21	<0,05
обострение	0		24±6	<0,02
Доноры	21,9±4,8		80±19	

моральной регуляции функций организма (Davies и соавторы, 1971; Engleman, Greenbaum, 1971; Weissmann и соавторы, 1972; Becker, 1976).

Согласно данным К. Н. Веремеенко и соавторов (1978), оптимум кининогеназной активности гомогенатов лейкоцитов у доноров и больных риносинуитами находится при двух значениях pH среды: в кислой зоне — pH 2,5 и слабощелочной — pH 7,6. У больных поллинозами в стадии обострения (в сезон цветения растений) активность фермента в кислой зоне pH практически отсутствует, максимум активности найден в зоне pH 7,6 (табл. 27).

В кислой зоне pH средние значения активности кининогеназы у доноров значительно ниже, чем в слабощелочной. У больных хроническим инфекционно-аллергическим ринитом активность кининобразующего фермента в кислой зоне pH значительно повышена по сравнению с донорами.

Можно предположить, что в условиях обострения аллергических реакций происходит лабилизация мембран лейкоцитов, с которыми, возможно, связаны кининогеназы. Последние освобождаются и под влиянием комплекса антиген — антитело. В этих случаях ферменты могут поступать из лейкоцитов в жидкую часть крови. Об этом свидетельствует факт нарастания активности калликреина в сыворотке крови у больных аллергическими ринитами (К. Н. Веремеенко и соавт., 1974). В плазме крови кининогеназы взаимодействуют с кининогеном плазмы с образованием вазоактивных полипептидов — кининов. Это вызывает как общие реакции организма (повышение температуры тела, СОЭ), так и местные (усиленная экссудация желез, гиперемия,

резкий отек слизистой оболочки, обильное пропитывание тканей транссудатом). Необходимо также учитывать возможность пролонгированного действия кининов в плазме крови в результате снижения активности кининаз, что отмечали некоторые исследователи у больных бронхиальной астмой (Chyrek-Borowska и соавторы, 1973).

Для выяснения механизмов развития аллергических реакций верхних дыхательных путей важным является исследование ферментных систем не только в общем кровотоке, но и в секрете слизистой оболочки носа. В клетках слизистой оболочки происходит первый контакт возбудителя с макроорганизмом, реакция антиген — антитело.

Аллерген соединяется с находящимися на тучных клетках реагинами, что приводит к дегрануляции клеток и освобождению биологически активных веществ. Наряду с эозинофилией это является признаком, характерным для аллергического воспаления (М. Ф. Королев, И. А. Заец, 1972).

Защитная роль определяется функцией слизистой оболочки, в частности двигательной способностью мерцательного эпителия, которая у больных аллергическими заболеваниями снижена в значительной мере (А. И. Корниенко, А. Е. Подольский, 1974). У больных аллергическими ринитами при обострении процесса отмечается большее отторжение бокаловидных клеток по сравнению с мерцательными. Секрет слизистой оболочки носа содержит нейтральные кислые и сульфатированные мукополисахариды, которые оказывают ингибирующее влияние на иммунный ответ (В. П. Быкова, 1974).

Ряд публикаций свидетельствует о наличии в секрете слизистой оболочки носа моноаминооксидазы (МАО), катализирующей окислительное дезаминирование серотонина. Фермент связан с митохондриями, особенно высокой активностью МАО обладают железистые структуры, в частности покровный респираторный и железистый эпителий слизистой оболочки носа и придаточных пазух. При развитии воспалительной реакции увеличивается секреция фермента, на высоте острого процесса активность фермента снижается, особенно в респираторном эпителии (В. П. Быкова, 1971).

В секрете слизистой оболочки носа присутствует лизоцим, играющий важную роль в неспецифической защите организма. Согласно нашим данным, его концентрация колеблется от 20 до 60 мкг/белка, составляя в среднем 45 мкг/мг белка.

С целью выяснения роли компонентов кининовой системы в механизме развития аллергических реакций верхних дыхатель-

Таблица 28. *Протеолитическая активность и содержание некоторых компонентов кининовой системы в секрете слизистой оболочки носа больных аллергическими ринитами ($M \pm m$)*

Обследуемые	Протаминрасщепляющая активность, мкмоль аргинина/мг белка	Антитриптическая активность, мкг/мг белка	Содержание свободных кининов, нг/мг белка	Активность кининазы, нг брадикинина/(мг·ч белка)
Больные хроническим инфекционно-аллергическим ринитом	$0{,}31 \pm 0{,}03$ $P > 0{,}5$	$45 \pm 5{,}4$ $< 0{,}05$	2—100 —	$27 \pm 2{,}0$ —
Больные поллинозом:				
обострение	$0{,}24 \pm 0{,}02$ $P < 0{,}01$	$20 \pm 2{,}5$ $< 0{,}05$	2—10 —	$27 \pm 3{,}0$ —
состояние ремиссии	$0{,}16 \pm 0{,}04$ $P < 0{,}001$	21 ± 3 $< 0{,}05$	4—11 —	$18 \pm 3{,}0$ $< 0{,}001$
Доноры	$0{,}30 \pm 0{,}003$	$30 \pm 3{,}7$	Не обнаружено	$27 \pm 1{,}5$

ных путей изучались показатели этой системы в носовом секрете больных аллергическими риносинуитами.

В носовом секрете обнаружены протеолитические ферменты с протаминрасщепляющим действием и кининазной активностью (табл. 28). У больных поллинозом в остром периоде заболевания и в состоянии ремиссии активность протеиназ и антитриптическая активность падает. Аналогичная картина наблюдается и в активности кининогеназы, которая у больных хроническими инфекционно-аллергическими ринитами и у больных поллинозами в остром периоде значительно снижена. У части больных всех групп в носовом секрете определяются свободные кинины, содержание которых значительно варьирует. Из 41 обследованного больного инфекционно-аллергическим ринитом у 16 обнаружены кинины, обладающие окситоциноподобным эффектом. Уровень их колебался в пределах от 2 до 100 нг/мг белка секрета; из них у 11 больных были обнаружены сопутствующие очаги хронической инфекции (чаще всего хронической тонзиллит, гепатохолецистит). Длительность заболевания у этих больных была более 8 лет, наблюдалось тяжелое течение заболевания — частые обострения, протекающие с выраженными клиническими проявлениями, по преимуществу они страдали гиперсекреторной формой заболевания. У 10 больных была резко выраженная сенсибилизация организма: интенсивные кожные пробы (+++, ++++) на антигены стафилококка и стрептококка, повышенное

содержание эозинофилов в периферической крови и носовом секрете. Из 3 больных с наиболее высокими показателями кининов у 2 риниту сопутствовала бронхиальная астма, у 1 — часто рецидивировала крапивница.

Наряду с протеолитическими ферментами в секрете слизистой оболочки носа выявлены ингибиторы протеиназ, что соответствует данным других исследователей (Hochstrasser и соавт., 1971; 1972; Reichert и соавт., 1972; Werle и соавт., 1972; Rasche и соавт., 1972), показавшими, что ингибитор слизистой оболочки носа угнетает трипсин, химотрипсин, проназу, протеиназу лейкоцитов. Этот низкомолекулярный пептид называют лизинингибитором, так как его активность обусловлена определенным остатком лизина в активном центре. Полагают, что ингибитор секрета выполняет защитную функцию — угнетает протеиназы, освобождающиеся из лейкоцитов при воспалительных процессах. Кроме того, он, вероятно, защищает мерцательный эпителий носовой и околоносовой области от возможного действия ферментов разрушенных лейкоцитов путем комплексообразования с протеиназами.

Снижение концентрации ингибиторов протеиназ в носовом секрете, выявленное у больных поллинозом, по-видимому, можно объяснить освобождением протеолитических ферментов и «перерасходом» ингибиторов на нейтрализацию их активности.

Представленные выше данные об активации протеиназ в общем кровотоке и пораженных тканях послужили основанием для разработки методов применения ингибиторов протеолиза, блокирующих образование кининов и других вазоактивных веществ.

ФЕРМЕНТЫ ПРИ ДРУГИХ ЛОРЗАБОЛЕВАНИЯХ

Разработка патогенетического лечения — это основная цель всех исследований, направленных на изучение этиологии, течения и всех особенностей, присущих тому или иному заболеванию. Эта задача еще далеко не разрешена для целого ряда заболеваний органа слуха, в том числе и для таких широко распространенных заболеваний, как хронические экссудативные отиты, отосклероз, поражения звуковоспринимающего аппарата — т. е. именно тех болезней уха, которые ответственны за подавляющее большинство случаев тяжелых дефектов слуховой функции.

Учитывая значение ферментов в функции органов, тканей и клеток организма, исследователи стали уделять более пристальное внимание особенностям функциональной активности ферментных систем при хронических заболеваниях уха. В послед-

нее время высказана новая точка зрения на патогенез отосклероза, в которой важная роль отводится активности ферментативных систем (Causse и соавт., 1973, 1974, 1976).

Впервые предположение о том, что отосклероз может обусловить поражение слухового рецептора в результате токсического воздействия на клетки кортиева органа «продуктов обмена» очага, поступающих в лабиринтные жидкости, высказал Siebenmann (1899). Эту гипотезу подтвердили Causse, Chevance (1961, 1969), Chevance, Causse, Berges (1976), Shambaugh, Causse (1974) и другие авторы. Согласно их данным, в основе развития отосклероза лежат сдвиги в ферментных системах. Образование капилляров и высокая васкуляризация отосклеротической кости при активно протекающем заболевании сопровождаются увеличением притока гистиоцитов, которые в значительно большей степени, чем остеокласты, ответственны за лизис окружающей очаг костной ткани, ибо литический процесс осуществляется при участии ферментов гистиоцитарных клеток. В перилимфе, взятой у больных отосклерозом, в 70—75% случаев из 224 проб Causse, Chevance (1973) выявили высокую протеолитическую активность, которая коррелировала с выраженностью нейросенсорного компонента тугоухости. Martin, Chevance (1978), изучив систему ингибиторов протеаз крови у больных отосклерозом и здоровых лиц, не выявили достоверных различий. На этом основании и с учетом ранее проведенных исследований авторы заключили, что протеиназы, повреждающие внутреннее ухо у больных отосклерозом, надо искать в гистиоцитах отоспонгиозного очага.

С помощью микроэлектрофореза в перилимфе больных отосклерозом выявлены ферменты: кислая фосфатаза (КФ), ЛДГ, рибонуклеаза, α-химотрипсин, коллагеназа. Последние два фермента обладают высокой протеолитической активностью, и это дало авторам основание сделать вывод об их основной ответственности за поражение внутреннего уха при отосклерозе. Chevance и соавторы (1976) установили в эксперименте на морских свинках, что трипсин оказывает повреждающее действие на волосковые клетки кортиева органа. Методом электронной кохлеографии они показали, что интенсивность и протяженность повреждения волосковых клеток, в основном наружных, зависит от концентрации трипсина.

Causse и соавторы (1977) сформулировали такую концепцию: нарушение равновесия протеиназ и их ингибиторов в отосклеротическом очаге приводит к повышению активности ферментов в различных отделах внутреннего уха; в зависимости от локализации очага в капсуле лабиринта клинически проявляется

специфический ответ в виде преобладания кондуктивного поражения слуха — если очаг локализуется у края окна преддверия, появляются соответствующие симптомы (неуверенность походки, головокружение и т. п.). Последнее подтверждается также исследованиями Ghorayeb, Linthicum (1978). С этих позиций Causse и соавторы (1973) объясняют инактивирующее действие фтористого натрия на отосклеротический очаг не столько ускоренной рекальцификацией последнего и образованием практически нерастворимого в тканевых жидкостях фтористого апатита в основном веществе очага, сколько способностью фтора тормозить и подавлять активность протеолитических ферментов. Было изучено in vitro действие фтористого натрия на протеолитическую активность 66 проб перилимфы. В 45% случаев выявлено выраженное тормозящее действие фтора на активность фермента, определяемую по растворению желатинового покрытия фотопленки при нанесении на нее проб перилимфы (Adams, Tugan, 1961).

Достигнутую более чем у половины больных кохлеарным отосклерозом, леченных длительным приемом фтористого натрия, стабилизацию слуха Causse и Chevance (1973) объясняют его антиферментным действием.

Shambaugh и Causse (1974) утверждают, что цитотоксические рассасывающие костную ткань энзимы могут быть выявлены по периферии активно растущего отоспонгиозного очага, где преимущественно сосредоточены продуцирующие их гистиоциты и остеокласты. Эти энзимы диффундируют из очага в жидкости внутреннего уха через эндост улитки или (что авторы считают менее вероятным) проникают в пери- и эндолимфу по костным канальцам из очага, еще не достигшего эндоста. Пробы перилимфы, взятые при слуховосстановительных операциях у больных отосклерозом, показали высокую корреляцию между активностью обнаруженных в ней энзимов и степенью поражения внутреннего уха. До операции больные находились под контролем в течение 2 лет, проходя полное аудиологическое обследование каждые 6 мес. Ранее высказанная концепция о патогенетическом значении при отосклерозе сдвигов в ферментативной активности перилимфы подтверждена Chevance и Causse (1976).

В патогенезе отосклероза большое значение имеют процессы оссификации и минерального обмена, оказывающие влияние на степень активности, рост и структуру отосклеротического очага. Среди ферментов, участвующих в процессах фосфорно-кальциевого обмена и оссификации, особого внимания заслуживает фермент гидролитического действия — щелочная фосфатаза (ЩФ).

Chevance (1961), Ricci (1961), Л. Г. Сватко (1974) отметили,

что в клеточных элементах отосклеротического очага — остеоцитах, остеобластах и молодых фибробластах — активность ЩФ повышена; это свидетельствует об активации остеобластических процессов.

Нарушение процесса остеогенеза составляет сущность общей скелетной патологии — osteogenesis imperfecta, с которым некоторые исследователи пытались связывать и отосклероз (Altmann, Kornfeld, 1967). Однако более поздние биохимические исследования активности ферментов, участвующих в катализе обменных процессов в соединительной ткани, в том числе и процессов остеогенеза, показали, что при отосклерозе значительно повышена активность только ЩФ, в то время как при несовершенном остеогенезе выявлены глубокие изменения активности ЛДГ и фосфофруктокиназы (Holdsworth и соавторы, 1973).

Наряду с локальными изменениями (в отосклеротическом очаге) выявлены также сдвиги в активности ферментов в общем кровотоке. Л. И. Волохонская, В. А. Гукович (1967, 1970) у большинства больных отосклерозом с незрелыми очагами выявили достоверное повышение активности ЩФ, содержания кальция при одновременном снижении неорганического фосфора в сыворотке крови. Высокую активность ЩФ в сыворотке крови и костной ткани больных отосклерозом установили также В. П. Фомина-Косолапова (1965), Н. Е. Плотникова и соавторы (1966), Soifer и соавторы (1969) и др. Эти данные указывают на значение в патогенезе отосклероза изменений в активности этого фермента.

К. Н. Веремеенко, Л. И. Волохонская (1972) исследовали изоферменты ЩФ в сыворотке крови у 64 больных отосклерозом. С помощью гельфильтрации на сефадексе G-200 у больных выявлен один ее изофермент, связанный с 7s-протеинами, а у здоровых людей имеются две фракции белков 7S и 19S, обладающие ферментативной активностью. Обнаружена высокая чувствительность изофермента ЩФ больных к температурному воздействию и влиянию мочевины. В связи с этим высказано предположение, что источником изофермента сывороточной ЩФ при данном заболевании является костная ткань.

Многие отохирурги, занимающиеся слуховосстановительными операциями при отосклерозе, отмечают в первые дни после вмешательства снижение слуха, которое нельзя объяснить ни обтурацией наружного слухового прохода кровяным сгустком, ни преходящим реактивным отеком слизистой оболочки среднего уха и барабанной перепонки. При ревизиях барабанной полости, проводимых как в послеоперационном периоде, так и в более отдаленные сроки, выявлено, что причиной резкого снижения слуха

была иммобилизация звукопроводящего механизма сгустками фибрина, превращавшимися впоследствии в шварты, сращения и гранулемы овального окна (А. И. Коломийченко и соавторы, 1963; В. Ф. Никитина, 1970; В. А. Гукович, 1972; Н. А. Преображенский, О. К. Патякина, 1973; Cody и соавторы, 1967; Gacek 1970). Для выяснения причины этого явления были изучены компоненты системы фибринолиза (К. Н. Веремеенко и соавторы, 1968; М. А. Хлечас, 1965). Было установлено отчетливое понижение активности фибринолитической системы крови у больных отосклерозом, еще более выраженное в послеоперационный период. Об этом свидетельствовало снижение спонтанной фибринолитической активности, содержания плазмина и никотиновой кислоты. Кроме того, наблюдалось повышение активности свертывающей системы крови. Эти факторы объясняют склонность к быстрому образованию сгустков крови и замедленному их рассасыванию в послеоперационном периоде, что способствует их организации, приводящей к ограничению подвижности цепи слуховых косточек и барабанной перепонки. Это послужило основанием к применению активатора фибринолиза — никотиновой кислоты с лечебной целью в первые дни после слуховосстановительных операций у больных отосклерозом (И. Л. Зарицкая, 1964). Имеются также единичные работы по изучению ряда ферментов при воспалительных заболеваниях среднего уха. Palva, Raunio (1975) изучили активность ЛДГ, МДГ, аспартат-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), КФ в пунктатах из среднего уха, активность которых в 20—30 раз выше, чем в сыворотке крови, в то время как активность эстераз ниже. В мукоидном содержимом среднего уха при некоторых формах хронического секреторного отита в эпителиальных клетках, слизистых железах обнаружено много кислых и нейтральных мукополисахаридов, присутствием которых авторы объясняют мукоидный характер экссудата. Аналогичные данные получили Pahor и соавторы (1976), исследуя содержание белков в экссудате из среднего уха у детей с гиперсекреторным отитом.

Senturia, Tos (1974) установили, что фиброциты, макрофаги, лимфоциты, плазматические и тучные клетки подслизистой оболочки среднего уха содержат гистамин, серотонин и гепарин; кроме того, они, возможно, продуцируют медиатор, увеличивающий сосудистую проницаемость при серозных отитах. В слизистой оболочке среднего уха вырабатываются также ферменты лизоцим и КФ: в 69 пробах, взятых от больных секреторными отитами, общая концентрация белков и активность ферментов ЛДГ, МДГ и КФ значительно выше, чем в сыворотке крови.

Kostenbauer и соавторы (1977) установили наличие в отделя-

емом среднего уха при гнойных отитах кислотостабильного низкомолекулярного ингибитора с поливалентным действием. Этот ингибитор обладает способностью тормозить активность трипсина, химотрипсина, проназы и протеиназ лейкоцитов. Его содержание в отделяемом варьирует на разных стадиях течения отита. В раннем послеоперационном периоде концентрация ингибитора протеиназ значительно снижалась по сравнению с дооперационной. При хроническом воспалении уровень ингибитора протеиназ остается низким, что авторы объясняют «эффектом использования» во время реакции между ним и протеиназами лейкоцитов.

В. Ш. Шахов и соавторы (1979) исследовали содержание гиалуроновой кислоты и активность гиалуронидазы в сыворотке крови 169 больных гнойным воспалением среднего уха. Они установили, что активность фермента тем выше, чем тяжелее протекает заболевание и более выражены деструктивные изменения. Авторы не только считают эти показатели важными в оценке степени распространенности гнойного процесса в ухе, но и предлагают использовать их для контроля эффективности проведенного лечения.

В заключение необходимо подчеркнуть, что энзимологические исследования при заболеваниях органа слуха еще находятся в стадии накопления фактов без должной их систематизации. Но уже имеющиеся данные свидетельствуют о важной роли ряда ферментов в патогенезе отосклероза и воспалительных заболеваний среднего уха.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ С ЛЕЧЕБНОЙ ЦЕЛЬЮ

Использование ферментов в медицине имеет многолетнюю историю. Еще в глубокой древности аборигены Антильских островов для лечения кожных заболеваний применяли сок дынного дерева, который, как теперь известно, содержит несколько протеолитических ферментов — папаин, химопапаин и пептидазу А. Млечный сок (латекс) этого растения использовался для ускорения заживления ран, ожогов, ушибов, а также в качестве косметического средства (для удаления веснушек и др.).

Ранняя история энзимотерапии тесно связана с развитием представлений о характере пищеварения у высших животных. В желудочном и панкреатическом соках были обнаружены ферменты, расщепляющие белки, углеводы и жиры. Это послужило стимулом для использования пищеварительных соков (в част-

ности, желудочного) и экстрактов пищеварительных желез для заместительной терапии. Наряду с этим неочищенные препараты ферментов начали применять с целью разрушения различных омертвевших тканей. Особое внимание привлекли протеазы — ферменты, гидролизующие белки.

Началом научно обоснованного применения энзимов как терапевтических средств в различных областях медицины следует считать 50-е годы XX в. Этому способствовали успехи в области препаративного выделения ферментов, которые привели к получению высокоочищенных кристаллических препаратов протеиназ — пепсина, трипсина, химотрипсина. Большая заслуга в области выделения препаратов ферментов принадлежит Нортропу и его сотрудникам, которые в 1930—1936 гг. разработали методы получения кристаллических препаратов протеиназ поджелудочной железы. Спустя 10—15 лет было налажено производство ферментов в промышленном масштабе и они стали достоянием клиницистов. Внедрению ферментных препаратов в лечебную практику способствовало также изучение их фармакологических и лечебных свойств как при местном, так и особенно при парентеральном (внутримышечном) их введении в организм. Наряду с этим для обоснованной терапии ферментами необходимо четкое понимание врачами свойств ферментов как веществ белковой природы, а также выяснение условий для проявления их действия. Знание специфических свойств ферментов позволило повысить эффективность энзимотерапии и избежать побочных реакций, которые могут наблюдаться при их применении.

Первое сообщение об использовании кристаллического трипсина в клинике появилось в 1950 г. Reiser и соавторы, применив фермент внутриплеврально для растворения вязких экссудатов при фибринозной эмпиеме, получили положительный эффект и не отметили побочных реакций. В 1952 г. Innerbield и соавторы вводили кристаллический трипсин внутривенно с целью лизиса тромбов и наблюдали выраженное противовоспалительное действие фермента, слабый тромболитический эффект, побочные реакции, степень выраженности которых находилась в прямой зависимости от скорости введения фермента. Оказалось, что противовоспалительное действие трипсина проявляется и при его внутримышечном введении, причем побочные реакции были минимальными. Наблюдения этих авторов послужили основанием для широкого использования протеиназ, вводимых внутримышечно при различных воспалительных процессах.

В нашей стране впервые К. Н. Веремеенко (1959) сообщил о применении кристаллических протеиназ поджелудочной железы в клинике и представил собственные данные, теоретически обос-

новывающие использование полученного им кристаллического трипсина, а также эффективность последнего в терапии острых тромбофлебитов. Эта публикация вызвала большой интерес врачей различного профиля к новой и весьма перспективной проблеме — использованию протеолитических ферментов в терапевтических целях. Автором был разработан лабораторный метод выделения препаратов кристаллического трипсина и химотрипсина для внутримышечного введения, изучены фармакологические и лечебные свойства парентерально вводимых протеиназ и их судьба в организме (К. Н. Веремеенко, 1961, 1962). Кроме того, был предложен специфический метод определения парентерально вводимого кристаллического трипсина в сыворотке крови, который позволил контролировать судьбу экзогенного фермента и время циркуляции в организме. Полученные препараты кристаллического трипсина и химотрипсина были испытаны в различных клиниках Украины. На основании клинических испытаний была разработана инструкция по применению кристаллического трипсина, утвержденная Фармакологическим комитетом МЗ СССР. Совместно с институтом биохимии АН УССР и Всесоюзным НИИ мясной промышленности нами были составлены технические условия на препарат «кристаллический трипсин», утвержденные Фармакопейным комитетом МЗ СССР. Отечественные препараты кристаллического трипсина и химотрипсина были применены впервые в ЛОРклинике Киевского НИИ отоларингологии им. профессора А. И. Коломийченко.

В настоящее время в отоларингологии с лечебной целью используются ферменты гидролитического действия: протеиназы, нуклеазы и мукополисахаридазы.

КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О БИОХИМИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ СВОЙСТВАХ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В КЛИНИКЕ

Протеолитические ферменты и их ингибиторы

Среди различных групп протеолитических (белокгидролизующих) ферментов в клинике и, в частности, в отоларингологии наиболее широко апробированы протеиназы поджелудочной железы — трипсин и химотрипсин.

Трипсин (КФ 3.4.4.4). Синтезируется ацинозными клетками поджелудочной железы в виде неактивного предшественника трипсиногена, который поступает в двенадцатиперстную кишку и активируется энтерокиназой кишечного сока. Это было установлено Н. П. Шеповальниковым в лаборатории И. П. Павлова.

Активация трипсиногена достигается гидролизом единственной пептидной связи около N-конца полипептидной цепи с освобождением гексапептида и образованием активной формы фермента.

Молекула трипсина состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 23 800. Последовательность аминокислотных остатков в молекуле этого фермента расшифрована полностью. Фермент имеет щелочные свойства: его изоэлектрическая точка находится при pH 10,1. Трипсин, как и химотрипсин, гидролизует пептидные связи, находящиеся внутри молекулы различных белков. Поэтому их называют эндопептидазами, в отличие от экзопептидаз, которые отщепляют концевые аминокислотные остатки в молекулах белков и пептидов. Большинство изолированных природных белков слабо переваривается протеиназами поджелудочной железы, однако их гидролиз резко усиливается после денатурации. В то же время некоторые нативные белки (например, фибриноген) очень быстро расщепляются трипсином. Трипсин катализирует гидролиз преимущественно пептидных связей в молекулах белков, в которых карбоксильная группа образована основными аминокислотами с положительно заряженной боковой цепью — аргинином или лизином. При определенных условиях можно установить его действие и на иные связи. Наряду с белками трипсин расщепляет и низкомолекулярные субстраты — сложные эфиры и амиды, т. е. обладает эстеразной и амидазной активностью. Скорость гидролиза сложных эфиров значительно выше, чем соответствующих амидов. Для определения активности трипсина чаще всего используют такие белковые субстраты, как гемоглобин и казеин, а из синтетических — N-замещенные эфиры аргинина и лизина: БАЭЭ, N-тозил-Z-аргининметиловый эфир (ТАМЭ), БАПНА.

Трипсин в определенных концентрациях ускоряет свертывание крови, катализируя реакцию превращения протромбина в тромбин.

Важным свойством, представляющим интерес не только в теоретическом, но и в практическом плане, является способность трипсина подвергаться при физиологическом значении pH самоперевариванию (аутолиз). При этом трипсин расщепляется на ряд фрагментов с потерей ферментативной активности. Аутолитическая инактивация наблюдается уже при pH свыше 5; она особенно сильно выражена при pH 7—9. Например, при pH 7,5 и температуре 36° С трипсин в концентрации 1 мг/мл, обычно применяемой в клинике, теряет за 2 ч около 85% своей исходной активности. Добавление к раствору трипсина (1 мг/мл) ионов кальция до концентрации $4 \cdot 10^{-3}$М в значительной степени предохраняет фермент от инактивации (К. Н. Веремеенко, 1971).

Для медицинских целей трипсин получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Метод основан на предварительном выделении из кислого экстракта железы (рН 3) профермента — трипсиногена с помощью фракционного высаливания $(NH_4)_2SO_4$. В кислой среде трипсиноген стабилен, легко растворим и спонтанно не активируется, что является необходимым условием для получения в последующем активной формы фермента. Трипсиноген кристаллизуется при рН 8 на холоде при 50% насыщении сернокислым магнием. Обычно в этих условиях при длительном выдерживании смеси трипсин кристаллизуется. После удаления солей диализом растворы трипсина стерилизуют, фильтруя через фильтры Зейтца, разливают во флаконы и высушивают методом лиофилизации. Обычно из 10 кг поджелудочной железы получают 5—6 г кристаллического трипсина. Для парентерального введения применяют только кристаллический трипсин, для местного — аморфный трипсин и химопсин (смесь трипсина и химотрипсина). Форма выпуска кристаллического трипсина — герметически закрытые флаконы по 0,01 г кристаллического белка-фермента. Химопсин расфасовывается во флаконы по 0,025, 0,05 и 0,1 г. Эти препараты легко растворимы в воде и физиологическом растворе. Флаконы с ферментом хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 10° С. Срок годности препарата указывается на флаконе.

α-Химотрипсин (КФ 3.4.21.1). Поджелудочная железа синтезирует этот фермент в виде неактивного предшественника — химотрипсиногена. Сейчас установлено, что ацинозные клетки железы продуцируют два химотрипсиногена — А и Б, которые различаются между собой физико-химическими свойствами: первый из них имеет катионные свойства, второй — анионные. Проферменты активируются в двенадцатиперстной кишке под действием трипсина. Наиболее изучена активация химотрипсиногена А, которая происходит под влиянием небольших доз трипсина (10 000 весовых частей профермента и 1 часть трипсина). В результате активации образуется несколько активных форм химотрипсина — α, β, γ, которые отличаются друг от друга по форме кристаллов и растворимости.

Для медицинских целей используют α-химотрипсин — белок с молекулярной массой 25 000 и ИЭТ при рН 8,1—8,3. Максимальная зона устойчивости наблюдается при рН 3. α-Химотрипсин состоит из трех полипептидных цепей, которые в третичной структуре стабилизированы водородными связями. В настоящее время с помощью рентгено-структурного анализа полностью расшифрованы третичная структура α-химотрипсина и строение его активного центра.

Химотрипсин гидролизует пептидные связи, карбонильная группа которых принадлежит остаткам ароматических аминокислот — фенилаланина, триптофана или тирозина. Однако он способен расщеплять в белках и другие связи. Аналогично трипсину химотрипсин обладает эстеразной и амидазной активностями, и сложные эфиры гидролизуются им значительно быстрее, чем амиды. В то же время химотрипсин в отличие от трипсина обладает способностью свертывать молоко, а также расщеплять девятичленный полипептид — брадикинин с потерей его биологической активности. Химотрипсин в слабощелочной среде подвергается автолизу, хотя и в меньшей степени, чем трипсин. Скорость автолиза химотрипсина резко возрастает с повышением температуры: при 30° С она в 30 раз выше, чем при 5° С. Исследование скорости автолиза при разных значениях pH (7—11) показало, что максимальная инактивация фермента наблюдается при pH 9,1—9,2. Хлористый калий оказывает стабилизирующее действие.

Медицинские препараты α-химотрипсина выделяют из поджелудочной железы быка. Вначале из кислого экстракта железы получают кристаллический химотрипсиноген, который 5 раз перекристаллизовывают, а затем активируют трипсином. Полученный фермент после стерилизации расфасовывают во флаконы по 0,01 г, лиофилизируют. Препарат хранится при температуре не выше 10° С. Как и трипсин, в сухом виде фермент устойчив.

В клинической отоларингологии протеиназы завоевали наибольшее признание. Предпосылкой к этому явились данные о том, что протеолитические ферменты поджелудочной железы обладают рядом лечебных свойств, проявляющихся при местном и парентеральном введении.

При локальном применении (аппликации, инстилляции, аэрозольные ингаляции, введение в полости, электрофорез) протеиназы проявляют высокую литическую активность в отношении нежизнеспособных тканей, сгустков крови. Характерным их свойством является способность избирательно расщеплять денатурированные белки некротических масс, практически не действуя на живые ткани, т. е. при помощи энзиматического лизиса из организма преимущественно удаляются белки омертвевших тканей. Такое избирательное действие ферментов объясняется наличием в неповрежденных тканях специфических ингибиторов, которые блокируют активность энзимов. Малая чувствительность природных (нативных) белков к действию протеиназ также связана с пространственными препятствиями, с недоступностью пептидных связей для активного центра фермента. При денатурации развертывается белковая молекула, в результате чего «об-

нажаются» пептидные связи, которые становятся более доступными для гидролиза ферментами (В. А. Белицер, 1950).

Наряду с некролитическим действием протеиназы обладают муколитическим эффектом, т. е. способностью расщеплять различные экссудаты и гнойные массы. Разжижая гнойные экссудаты, ферменты понижают их вязкость, что приводит к улучшению дренажной функции в области очага воспаления и созданию условий для ускорения регенерации ткани. Муколитическое свойство ферментов широко используется клиницистами при заболеваниях, ведущим симптомом которых является наличие вязкого трудноотделяемого экссудата. Благодаря активному расщеплению и удалению некротических масс белков экссудата создаются неблагоприятные условия для микроорганизмов, а также улучшается контакт антибактериальных препаратов с микробной клеткой. В гнойном экссудате эффект антибиотиков ослаблен или вовсе отсутствует.

Большинство авторов полагают, что протеиназы могут оказывать косвенное влияние на микрофлору, механизм которого полностью не расшифрован. Krober (1955), Innerfield и соавторы (1956) показали уменьшение количества туберкулезных палочек и неспецифической микрофлоры при интракавернозном введении трипсина, что объясняется устранением благоприятной среды для размножения микроорганизмов. Протеиназы разрушают ряд вирусов и бактериальных токсинов. Культура вируса Herpes simplex после обработки 0,5% раствором трипсина в течение 10 мин инактивируется и теряет способность адсорбироваться на оболочках живых клеток (Liegl и соавторы, 1963). Трипсин также снижает инфекционность и антигенные свойства вируса ящура. Richou и соавторы (1962) установили, что под влиянием трипсина стафилококковый токсин почти полностью теряет антигенные свойства.

Важное лечебное свойство ферментов протеолиза заключается в способности повышать эффективность антибактериальных препаратов. Согласно данным Н. М. Данющенковой и др. (1978), сочетанное парентеральное применение химотрипсина с линкомицином при экспериментальной стафилококковой инфекции уменьшает обсемененность микрофлорой внутренних органов, патогенность культуры стафилококков, снижает смертность животных, приводит к утрате лецитиназной и плазмокоагулирующей активностей. Механизм этого действия частично связан со способностью протеиназ, вводимых парентерально, повышать концентрацию антибиотиков в тканях и крови. Под воздействием ферментов нарушается прочность пиогенной мембраны, и антибиотики в более высоких дозах могут проникать в очаг воспа-

ления (Giannoni и Zini, 1968). По данным В. Г. Королевой и соавторов (1974), при введении крысам трипсина (химотрипсина) с канамицином повышается концентрация канамицина в большинстве органов и тканей, а также пролонгируется его действие. Трипсин, введенный животным, повышает проницаемость гемато-энцефалического барьера для антибиотиков и барбитуратов (К. Н. Веремеенко, 1959). Согласно данным Moss и соавторов (1957), ускоряется проникновение пенициллина в спинной мозг после внутримышечного введения трипсина. Полагают, что последний повышает проницаемость эндотелия капиллярной стенки и окружающих ее тканей путем деполимеризации белковых структур.

Свойство протеиназ повышать концентрацию антибиотиков в тканях используется клиницистами в тех случаях, когда необходимы более высокие их концентрации в тканях, а также затруднен доступ антибактериальных препаратов в очаг поражения из-за наличия некротических масс (В. И. Стручков и соавт., 1970, 1975, и др.).

Ферменты не только усиливают активность антибиотиков, но и способствуют снижению резистентности к ним различной микрофлоры. Е. А. Говорович и соавторы (1967) установили, что у больных с гнойными процессами в легких, которых лечили антибиотиками в сочетании с протеолитическими ферментами животного и бактериального происхождения, уменьшается количество штаммов микроорганизмов, устойчивых к левомицетину, эритромицину и мономицину; микрофлора адаптируется к антибиотикам в этих случаях медленнее, чем у больных, получавших только антибиотики. Согласно экспериментальным данным Н. М. Данющенковой и соавторов (1978), под влиянием комбинированного лечения химотрипсином и линкомицином штаммы стафилококков, выделенные из организма животных, приобретают чувствительность к тем антибиотикам, к которым они были малочувствительны или вовсе не чувствительны.

При совместном локальном введении ферментов и антибиотиков необходимо учитывать, что ряд широко применяемых антибиотиков (пенициллин, колимицин, мицерин) подавляют активность ферментов. Препараты пенициллина, выпускаемые различными заводами, снижают активность фермента в неодинаковой мере (К. Н. Веремеенко, 1967).

В результате клинико-экспериментальных исследований установлено, что протеиназы поджелудочной железы оказывают противовоспалительное и особенно противоотечное действие (К. Н. Веремеенко, 1962, и др.), которое выражено при внутримышечном и защечном введении. Механизм этого действия

весьма сложен, так как в тканях и крови содержатся специфические вещества, блокирующие активность экзогенно вводимого фермента. Противовоспалительное свойство протеиназ, обусловленное специфической протеолитической активностью фермента, а не белковой молекулой как таковой, проявляется после всасывания ферментов в кровь. Наши исследования (К. Н. Веремеенко, 1962, 1967) показали наличие в сыворотке крови активного трипсина после его внутримышечного введения. Попадая в кровь, трипсин связывается с белковыми ингибиторами α-глобулиновых фракций и в таком состоянии не расщепляет белковые субстраты (казеин, гемоглобин, белки крови), но сохраняет способность гидролизовать щелочной белок протамин. Используя это свойство ферментов, мы предложили специфический метод определения парентерально вводимого фермента (K. N. Weremeenko, V. A. Belitzer, 1963).

Такое сужение субстратной специфичности трипсина и других протеиназ, как оказалось, связано с наличием в α_2-глобулиновой фракции сыворотки крови высокомолекулярного белка, названного нами ингибитором I (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1964). По химической природе он представляет собой α_2-МГ. В соединении с α_2-МГ трипсин и другие протеиназы (химотрипсин, плазмин, тромбин, калликреин) образуют активный комплекс с ограниченными ферментативными функциями. Важно также, что фермент в комплексе с α_2-МГ стабилизируется, становится нечувствительным к действию других ингибиторов крови, что обеспечивает его длительную циркуляцию в организме (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1975). Часть введенного фермента в крови инактивируется полностью в результате связывания с ингибитором α_1-глобулиновой фракции — α_1-АТ.

Таким образом, в циркулирующей крови отсутствует свободный трипсин и, вероятно, другие трипсиноподобные протеиназы. Они находятся в связанном состоянии с α-глобулинами плазмы, причем фермент, связанный с α_2-МГ, проявляет ограниченную активность. Как показали наши исследования, уже через несколько часов после внутривенного введения трипсина концентрация его в периферической крови резко снижена, а через сутки он полностью исчезает. При внутримышечном введении трипсин не определяется в циркулирующей крови животных уже через несколько часов. Это нельзя отнести за счет его спонтанной инактивации, очевидно, он может задерживаться тканями.

Следовательно, всасываясь в кровь, потенциально активный фермент переносится к тканям в виде комплекса α_2-МГ — трипсин. Остается невыясненной природа субстратов, которые в очаге поражения расщепляются комплексом α_2-МГ — протеиназа,

что приводит к ликвидации воспалительных реакций. Можно полагать, что парентерально вводимые протеиназы действуют на вазоактивные полипептиды типа брадикинина. Химотрипсин, в частности, обладает способностью расщеплять брадикинин с потерей его биологической активности. Можно допустить, что инактивация брадикинина и его аналогов может явиться одним из механизмов, ответственных за противовоспалительное действие протеолитических ферментов.

Ингибиторы протеиназ. В тканях различных органов (поджелудочной железе, легких, слюнных железах), сыворотке крови, других биологических жидкостях человека и животных, а также в растениях содержатся ингибиторы белковой или полипептидной природы, которые вызывают либо полное торможение, либо частичное ограничение ферментативных функций ряда протеиназ. Они являются фактором регуляции активности ферментов протеолиза, различаются молекулярной массой, аминокислотным составом, специфичностью действия. Ингибиторы, выделенные из животных тканей, представляют собой полипептиды с молекулярной массой около 6000, а ингибиторы из сыворотки крови имеют белковую природу и бо́льшую молекулярную массу, достигая как в случае с сывороточным ингибитором протеиназ — α_2-МГ — 820 000.

В сыворотке крови обнаружено несколько ингибиторов протеиназ.

Среди них наиболее подробно изучены α_1-антитрипсин (α_1-АТ) и α_2-МГ. α_1-АТ содержится в сыворотке в концентрации 210—500 мг%, он ответствен за 90% ее общей антитриптической активности. Этот ингибитор подавляет активность не только трипсина, но и химотрипсина, плазмина, эластазы, протеолитических ферментов из лейкоцитов и бактерий. Содержание α_1-АТ в сыворотке крови резко повышается при воспалительных процессах, что позволило отнести его к белкам острой фазы воспаления.

α_2-МГ — один из основных белков α_2-глобулиновой фракции — составляет около 4% общего содержания белков сыворотки. Этот ингибитор, впервые описанный нами (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1964), резко отличается от α_1-АТ. Он вызывает не полную, а частичную инактивацию таких ферментов, как трипсин, α-химотрипсин, плазмин, калликреин, тромбин. α_2-МГ полностью подавляет активность указанных ферментов при использовании в качестве субстратов белков и лишь частично — при расщеплении низкомолекулярных синтетических субстратов. α_2-МГ является регулятором ферментативной активности протеиназ, участвующих в процессах свертывания крови, фибри-

нолиза, кининогенеза, иммунных реакциях (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1975; К. Н. Веремеенко, 1977).

Для терапевтических целей используются лишь ингибиторы из тканей поджелудочной железы, легких, слюнных желез (белковые ингибиторы из сыворотки крови и растений ввиду токсичности оказались непригодными). Ингибиторы протеиназ, выделенные из указанных тканей, обладают широким спектром действия: они тормозят протеолитическую, эстеразную и кининогеназную активность трипсина, калликреина, плазмина, тромбина, бактериальных протеиназ, коллагеназы. Их называют поэтому поливалентными ингибиторами протеиназ, или калликреин-трипсиновыми ингибиторами (К. Н. Веремеенко, А. И. Кизим, 1975).

Поливалентные ингибиторы протеиназ имеют основный характер с ИЭТ при рН 10,5. Они устойчивы к нагреванию в нейтральной и кислой среде; при рН 6—11 образуют с протеиназами неактивный комплекс с потерей биологической активности ферментов. При физиологических значениях рН среды константа диссоциации комплекса очень низкая, степень диссоциации увеличивается с уменьшением рН. При рН 4 комплекс фермент — ингибитор диссоциирует на составные компоненты.

В настоящее время медицинские препараты калликреин-трипсиновых ингибиторов поступают в продажу под разными названиями. Зарубежные фирмы выпускают ряд препаратов, которые допущены для применения в нашей стране. Западногерманская фирма «Bayer» выпускает препарат трасилол в ампулах по 25 000 калликреиновых единиц (калликреиновая единица — КИЕ — это количество ингибитора, которое тормозит в биологическом тесте активность 2 интернациональных единиц калликреина на 50%). В ГДР производится ингибитор в виде порошка под названием «контрикал». Активность его выражается в антитрипсиновых единицах (ЕД). В одном флаконе содержится 10 000 ЕД (1 ЕД эквивалентна 3 КИЕ трасилола). В Венгрии завод «Гедеон Рихтер А. О» производит препарат гордокс по 100 000 ЕД в ампуле, в Швейцарии выпускается цалол, во Франции — инипрол и др. В нашей стране налажен выпуск аналога трасилола, получаемого из поджелудочной железы, под названием «пантрипин». Препарат выпускается в виде порошка во флаконах по 6, 12, 16, 20, 30 ЕД. 1 ЕД пантрипина соответствует примерно 800 КИЕ трасилола.

Наряду с природными в клинике используют также синтетические препараты ингибиторов. В числе их ε-АКК и парааминобензойная кислота (ПАМБК), также 4-амино-метилциклогексан-карбоновая кислота (АМЦГК). Эти вещества в основном

применяют при фибринолитических кровотечениях, возникающих после оперативных вмешательств на предстательной железе, легких, матке, миндалинах. Отмечено их положительное влияние при лечении аллергических заболеваний. Главной точкой их приложения является подавление процессов превращения плазминогена в активный плазмин. Трипсин, химотрипсин, плазмин и другие протеиназы мало или совсем не чувствительны к данным соединениям.

Нуклеазы

Эта группа ферментов катализирует деполимеризацию рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот (РНК и ДНК), разрывая межнуклеотидные связи в их молекулах. Их соответственно назвали рибонуклеазы (РНК-азы) и дезоксирибонуклеазы (ДНК-азы). Для медицинских целей представляют интерес эндонуклеазы, расщепляющие фосфодиэфирные связи внутри молекулы нуклеиновых кислот.

Рибонуклеаза (КФ 3.1.4.22). Наиболее полно изучена и нашла широкое применение в клинике РНК-аза, которая получена из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Этот белок с молекулярной массой 14 000 состоит из 124 аминокислотных остатков, соединенных в одну полипептидную цепь, оптимум pH 7,4—7,5. Наличие 4 дисульфидных связей скрепляет макромолекулу фермента и придает ей устойчивость. Установлена трехмерная структура РНК-азы и осуществлен ее химический синтез.

Процесс разрушения РНК панкреатической РНК-азой протекает в несколько стадий (В. С. Шапот, 1968). Вначале фермент расщепляет межнуклеотидные связи неспирализованных участков полинуклеотидной цепи с образованием олигонуклеотидов. При этом гидролизуются связи между фосфором и углеродом (C_5) рибозного остатка с последующим трансфосфорилированием внутри молекулы и образованием циклических (2′, 3′)-фосфорных производных. Далее РНК-аза гидролизует циклические (2′, 3′)-фосфодиэфирные связи с образованием 3′-фосфатных производных. Эта реакция протекает медленно. Панкреатическая РНК-аза гидролизует межнуклеотидные связи избирательно в зависимости от природы азотистых оснований, входящих в нуклеотиды. Она предпочтительнее расщепляет фосфоэфирные связи пиримидиновых нуклеотидов в молекуле РНК. Это обусловлено способностью их образовывать водородные связи с определенными групами в молекуле фермента. РНК-аза с большой скоростью гидролизует фосфодиэфирные связи в нуклеотидах, содер-

жащих в качестве азотистого основания цитозин. Она не расщепляет ДНК и олигодезоксирибонуклеотиды.

РНК-аза в отличие от протеиназ поджелудочной железы обладает высокой устойчивостью к повышению температуры. Водные растворы РНК-аз стабильны в широкой зоне pH при температуре до 25° С. Фермент наиболее устойчив в кислой среде: при pH 2—3 он выдерживает кратковременное (5-минутное) кипячение с незначительной потерей активности. Наибольшая активность фермента — при 65° С. Ионы Ca^{++}, Mn^{++} инактивируют РНК-азу.

Для клинических целей РНК-азу получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота по методу Кунитца. Отечественная промышленность выпускает препарат РНК-азы в аморфном виде. Форма выпуска — герметически закрытые флаконы, содержащие 0,01 г фермента. Препарат — порошок белого цвета, легко растворим в воде и физиологическом растворе. Фермент применяется местно в виде аэрозольных ингаляций, а также внутримышечно.

Дезоксирибонуклеаза (КФ 3.1.4.5). Этот фермент вызывает деполимеризацию ДНК гидролизом в ней межнуклеотидных связей, в то время как РНК-аза вначале деполимеризует молекулу РНК с образованием циклических нуклеотидов.

В тканях животных обнаружена ДНК-аза двух типов: ДНК-аза I с оптимумом pH в нейтральной или слабощелочной среде и ДНК-аза II с оптимумом действия в кислой среде. Наиболее изучена и нашла применение в медицинской практике панкреатическая ДНК-аза с оптимумом действия около pH 8,0. Фермент получен в кристаллическом виде Кунитцем в 1948 г. Его молекулярная масса равна 30 000, молекула состоит из одной полипептидной цепи. Ионы Mg^{++} и Mn^{++}оказывают активирующее действие на фермент. ДНК-аза гидролизует фосфодиэфирные связи в полинуклеотидной цепи между углеродом в 3′-положении и фосфором с образованием олигонуклеотидов с 5′-концевым фосфором или 5′-мононуклеотидов.

Выпускаемые в стране медицинские препараты ДНК-азы из бычьей поджелудочной железы представляют собой порошок белого цвета без запаха, легко растворимый в воде. Форма выпуска — герметически закрытые флаконы, содержащие по 10, 25, 50 мг аморфного препарата.

Способность нуклеаз вызывать деполимеризацию РНК и ДНК послужила основанием для использования РНК-аз и ДНК-аз для лизиса гнойных экссудатов. Особый интерес в этом плане заслуживает ДНК-аза, поскольку в гное содержатся большие количества ДНК, которая представляет собой высокополимерное

соединение. По данным Lloyd (1968), содержание ДНК в гное составляет от 30 до 70% его сухой массы. Значительную часть гноя составляют лейкоциты, в ядрах которых содержатся дезоксирибонуклеопротеиды, состоящие из 2 биополимеров — ДНК и белка. Трудность удаления гноя из патологических очагов обусловлена не только локализацией этих очагов, но и вязкостью гноя. Локальное применение ДНК-азы или введение ее в полости носа, суставов, плевры способствует резкому снижению вязкости гнойных экссудатов, улучшению оттока экссудата из воспалительного очага.

Наряду с муколитическим эффектом, нуклеазы способны расщеплять некротические массы, состоящие из нуклеопротеидов, потому они используются с целью некролитической терапии.

Поскольку нуклеазы гидролизуют нуклеиновые кислоты, а протеолитические ферменты расщепляют белки, весьма перспективно применять нуклеазы и протеазы сочетанно при различных гнойно-воспалительных процессах. Комбинация двух групп ферментов, действующих на основные субстраты воспалительного очага, способствует более глубокому расщеплению некротических тканей и экссудатов. Однако такая комбинация не всегда возможна. По данным К. Н. Веремеенко (1971), ДНК-аза быстро разрушается трипсином, а панкреатическая РНК-аза не инактивируется трипсином и химотрипсином. Следовательно, для клинического применения можно рекомендовать комбинацию протеиназ с РНК-азой.

Важным лечебным свойством нуклеаз является их способность тормозить размножение ряда патогенных вирусов (Р. И. Салганик, 1963). ДНК-аза задерживает развитие таких содержащих ДНК вирусов, как аденовирус, вирус гриппа, герпеса. РНК-аза тормозит размножение вирусов полиомиелита в культуре тканей, так как, проникая в зараженную ими клетку, они теряют свою белковую оболочку. Внутри клетки вирусная нуклеиновая кислота, свободная от белка, подвергается действию нуклеаз, что приводит к инактивации вируса. Р. И. Салганик установил, что противовирусное действие РНК-азы обусловлено ее специфической каталитической активностью, а не просто образованием ее комплекса с вирусом.

Клинические наблюдения показали эффективность РНК-азы в лечении клещевого энцефалита (Б. М. Глухов, 1967, и др.). ДНК-аза оказалась эффективным средством в терапии аденовирусных конъюнктивитов и герпетических кератитов (О. Я. Херсонская, 1965, и др.).

Ферменты нуклеинового катаболизма пытаются использовать в лечении опухолей (С. Е. Манойлов, 1966). Полагают, что при-

менение РНК-азы способствует деполимеризации высокополимерных РНК, приводящей к нарушению биосинтеза белка на рибосомах опухолевой ткани. Необходимы дальнейшие экспериментальные исследования в этом направлении с целью выработки показаний к применению нуклеаз в комплексной терапии злокачественных новообразований.

В последние годы в зарубежных клиниках препараты РНК-азы применяются парентерально в качестве противовоспалительных средств. Кристаллические препараты РНК-азы оказывают эффект при лечении гнойно-воспалительных процессов в гинекологии, лечении карбункулов, хронических остеомиелитов и др. (Lloyd, 1968, и др.).

Мукополисахаридазы

Среди различных представителей этой группы ферментов в медицинской практике нашли применение препараты гиалуронидазы и лизоцима.

Гиалуронидаза (КФ 4.2.2.1). Катализирует гидролиз гиалуроновой кислоты и гликопротеидных комплексов. Гиалуроновая кислота является высокополимерным полисахаридом, в состав которого входят многократно повторяющиеся фрагменты — ацетилглюкозамин и глюкуроновая кислота. Высокая вязкость растворов гиалуроновой кислоты и ее способность связывать воду играют важную роль в тургоре соединительной ткани, уменьшая ее проницаемость. Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту и уменьшает ее вязкость, способствуя проницаемости тканей. Она содержится в тканях животных и микроорганизмах. Фермент обнаружен в печени, селезенке, костной ткани, семенниках.

Для медицинских целей препараты гиалуронидазы получают из семенников крупного рогатого скота. Отечественная промышленность выпускает два препарата гиалуронидазы— лидазу (для парентерального введения, в ампулах по 64 ЕД активности) и ронидазу (предназначенную для наружного применения, во флаконах по 5 и 10 г препарата).

Терапевтическое действие гиалуронидазы основано на ее способности вызывать гидролиз гиалуроновой кислоты — основного субстрата соединительной ткани. Это свойство фермента используется при лечении рубцовых образований — склеродермии, контрактур суставов, ожогов, фиброзных тканей. Прибавление препаратов гиалуронизады к анастезирующим веществам ускоряет всасывание последних и способствует более глубокому проникновению их в ткани и уменьшению отека.

Лизоцим (КФ 3.2.1.17). Это — мукопептид-гликогидролаза — фермент мукополисахаридазного действия, широко распространен в природе. Фермент обнаружен в тканях и биологических жидкостях животных и человека, насекомых, растениях, грибах и бактериях. Поэтому более точно говорить о группе лизоцимов. Лизоцимы — это низкомолекулярные белки основного характера. Они гидролизуют β-1,4 связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезокси-2-глюкозы в мукополисахаридах или мукопептидах. Полностью расшифрованы трехмерная структура лизоцима и строение его активного центра. Естественным субстратом лизоцима являются наружные оболочки бактериальной клетки. Наиболее чувствителен к лизоциму Micrococeus lysodeikticus, который широко используется при определении активности фермента.

Наиболее изучен лизоцим, полученный из яичного белка. Фермент выделен в кристаллическом виде и нашел применение в клинике в качестве лекарственного средства (О. В. Бухарин, Н. В. Васильев, 1974). Молекулярная масса — около 14 000, ИЭТ — 10,5—11,0. Лизоцим устойчив к действию трипсина, но расщепляется пепсином. Оптимум pH действия лизоцима — 5—7, ионная сила среды — 0,1. Фермент стабилен в кислой среде, но инактивируется в щелочной. Максимальная активность проявляется при 60 °С, выше этой температуры он обратимо инактивируется. В сухом виде лизоцим сохраняет активность даже после двухчасовой стерилизации воздухом, нагретым до 160° С. Отечественной промышленностью (Олайнский завод химреактивов) выпускаются нестерильные препараты лизоцима по 1—5 г во флаконе, которые хорошо растворимы в физиологическом растворе. Они могут быть использованы для местного введения, а также электрофореза.

Терапевтический эффект лизоцима связан с его антимикробным действием, зависящим от ферментативных свойств данного белка. Лизоцим расщепляет полностью или частично клеточные стенки многих видов микробов, состоящие из мукопептидов, глюкозаминопептидов и хитинов. Грамположительные микроорганизмы более чувствительны к лизоциму, чем грамотрицательные. Различия в действии фермента на эти две группы микроорганизмов объясняются неодинаковым химическим составом их клеточных стенок. Спектр действия лизоцима ограничен микробами-сапрофитами, хотя он подавляет и некоторые штаммы патогенных микробов, в том числе бацилл, кокков, вибрионов. Обработка микробной клетки лизоцимом приводит к изменению ее поверхности, образованию множественных отверстий в клеточной стенке и дезорганизации структурных компонентов клетки.

В культуре ткани лизоцим тормозит репродукцию вирусов, что, по-видимому, связано со стимуляцией синтеза интерферона. Помимо этого, он инактивирует некоторые бактериальные токсины.

Антимикробный эффект лизоцима значительно усиливается в комбинации с некоторыми антибиотиками, в частности со стрептомицином. Это послужило основанием для создания комплексных препаратов лизоцима с антибиотиками (например, лизоцим с метициллином эффективно действует на золотистый стафилококк).

Помимо антимикробного фермент оказывает регенерирующее и обезболивающее действие. Анельгезирующие свойства лизоцима отмечены при лечении язв желудка, двенадцатиперстной кишки (Gasparo и соавторы, 1964). При лечении ожогов лизоцимом наблюдалось быстрое освобождение тканей от некротических масс, стимуляция гранулирования и эпителизация ран (Т. В. Голосова и соавт., 1972). Необходимо отметить противовоспалительное действие лизоцима, благодаря чему этот фермент нашел широкое применение в терапии ЛОР и бронхолегочных заболеваний, патологии женской половой сферы.

Имеются сведения об антикоагулянтном действии лицозима, что позволяет использовать его при кровотечениях у больных с язвой двенадцатиперстной кишки, после простатэктомии, при хирургических вмешательствах на печени.

Препараты оказывают лечебное действие при внутримышечном и локальном применении.

Данные литературы, касающиеся лечебных свойств лизоцима, обобщены в монографии О. В. Бухарина и Н. В. Васильева «Лизоцим и его роль в биологии и медицине» (1974).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОБОСНОВАНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ФИЗИОТЕРАПИИ

С лечебной целью ферменты вводят различными путями. Для ЛОРклиники особый интерес представляет введение ферментов физическими методами. Наиболее часто применяется лекарственный электрофорез в постоянном электрическом поле, а также ингаляции аэрозолей ферментов.

Метод электрофореза, в котором сочетается действие фермента и небольших дозировок постоянного тока, имеет ряд преимуществ по сравнению с применением ферментных препаратов парентерально. С помощью электрофореза фермент можно вводить непосредственно в ткань патологического участка с нарушенным кровообращением из-за некрозов, инфильтратов, тромбоза сосудов, а также создать более высокие концентрации

фермента в пораженном участке при меньших суммарных его дозах. При их введении методом электрофореза обычно не возникает местных и общих аллергических реакций, которые часто наблюдаются при парентеральном введении ферментов, так как последние, являясь для организма чужеродными белками, обладают антигенными свойствами.

Ниже изложены главным образом биохимические обоснования для применения ферментов методом электрофореза. Имеющиеся в руководствах сведения по электрофорезу часто не учитывают физико-химических свойств ферментов — веществ белковой природы, которые очень чувствительны к влиянию pH среды, температуры, ионов тяжелых металлов и другим воздействиям (В. С. Улащик, 1975, 1976). Поэтому при лечебном применении ферментов методом электрофореза следует учитывать их устойчивость в растворителе, подвижность и полярность, что важно для правильного выбора полюса, с которого будет вводиться фермент (К. Н. Веремеенко, 1977).

Для определения полярности необходимо помнить, что ферменты — амфотерные электролиты: в их молекулах имеются свободные карбоксильные группы (—COOH), обладающие кислыми свойствами, благодаря отщеплению ионов водорода, и аминогруппы ($—NH_2$), способные присоединять ионы водорода, приобретая при этом положительный заряд и придавая молекуле фермента щелочные свойства. Степень ионизации этих групп зависит от pH среды: карбоксильные группы полностью диссоциируют в щелочной среде, а аминные — в кислой. Значение pH среды, при котором белковая молекула имеет одинаковое количество положительно и отрицательно заряженных групп, называется ИЭТ. В ИЭТ белки, будучи электронейтральными, неподвижны в электрическом поле постоянного тока. Белки, как и другие лекарственные вещества, могут быть введены методом электрофореза не в молекулярной форме, а в виде ионов. Поэтому электрофорез должен проводиться в растворах с pH, удаленных от ИЭТ вводимого фермента в более кислую или щелочную зону. При этом белок приобретает положительный либо отрицательный заряд. Так, при добавлении водородных ионов (подкисление) подавляется диссоциация карбоксильных групп, белок приобретает катионные свойства и движется к катоду. Подщелачивание среды ведет к диссоциации $—NH_3^+$ групп, которые превращаются в недиссоциированную форму ($—NH_2$), что приводит к преобладанию в белковой молекуле отрицательно заряженных групп. В этом случае белок находится в форме аниона и передвигается в электрическом поле к аноду. Таким образом, при варьировании pH среды один и тот же фермент

Таблица 29. *Изоэлектрические точки и полярность препаратов ферментов и их ингибиторов*

Препараты	ИЭТ	Заряд препаратов при различных значениях pH среды				Полюс, с которого следует вводить препарат в растворе с pH 7,0
		pH	заряд	pH	заряд	
Трипсин	10,5	0—10,5	(+)	10,5—14,0	(—)	+
α-химотрипсин	8,3	0—8,3	(+)	8,3—14,0	(—)	+
ДНК-аза	5,0	0—5,0	(+)	5,0—14,0	(—)	—
РНК-аза	8,0	0—8,0	(+)	8,0—14,0	(—)	+
Лидаза (гиалуронидаза)	5,7	0—5,7	(+)	5,7—14,0	(—)	—
Лизоцим	10,7	0—10,7	(+)	10,7—14,0	(—)	+
Трасилол	10,5	0—10,5	(+)	10,5—14,0	(—)	+

можно вводить как с положительного, так и с отрицательного полюса.

ИЭТ белков-ферментов может находиться в кислой, нейтральной, щелочной и даже сильно щелочной среде. В табл. 29 приведены значения ИЭТ некоторых ферментов, применяемых для лечебных целей, а также знаки заряда их молекул при нейтральном значении pH среды. ИЭТ трипсина, α-химотрипсина, рибонуклеазы, лизоцима, трасилола(ингибитор протеолитических ферментов белковой природы) лежит в щелочной зоне, следовательно, в среде с pH ниже ИЭТ (в частности, pH 7) эти белки являются катионами и должны вводиться с положительного полюса. В более щелочной зоне, чем ИЭТ, они приобретают отрицательный заряд и полюсом их введения становится катод. Ферменты гиалуронидаза и ДНК-аза, у которых ИЭТ находится в кислой среде, при pH 7 заряжаются отрицательно и должны вводиться с катода. При значениях pH среды ниже ИЭТ они будут иметь положительный заряд и поэтому их следует вводить с анода.

В качестве иллюстрации приведены данные электрофореза ряда ферментных препаратов, выпускаемых отечественной промышленностью. Из рис. 4 видно, что трипсин и α-химотрипсин в нейтральной среде (pH 7) обладают свойствами катиона и передвигаются к катоду, причем быстрее мигрирует трипсин, ИЭТ которого по сравнению с α-химотрипсином (ИЭТ 8,3—9,1) сдвинута в более щелочную сторону (pH 10,1). При смешивании двух ферментов их электрофоретические свойства не изменяются.

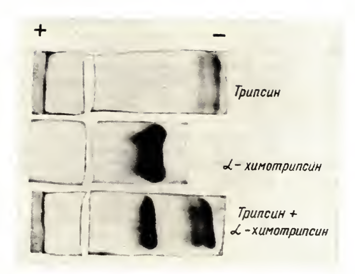


Рис. 4. Электрофореграммы препаратов трипсина, α-химотрипсина и их смеси.

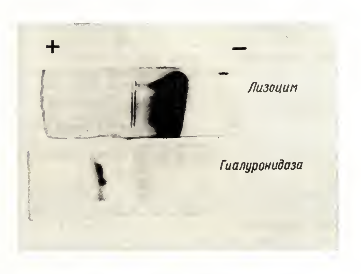


Рис. 5. Электрофореграммы препаратов лизоцима и гиалуронидазы.

Препараты лизоцима при pH 7 (рис. 5), как следует из его ИЭТ (10, 7), передвигаются к катоду, а гиалуроидазы с ИЭТ 5,7 — к аноду.

С. Д. Верник (1971), Н. Ф. Извекова, Э. И. Жибицкая (1971) рекомендуют вводить трипсин в растворе с pH 8—9 с отрицательного полюса, что, учитывая приведенные выше данные, неверно.

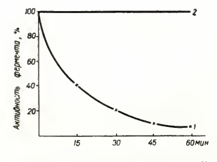


Рис. 6. Активность трипсина в 1% растворе бикарбоната натрия (1) и в физиологическом растворе (2).

Для электрофореза фермента важно правильно выбрать растворитель, чтобы pH раствора был отдален от ИЭТ, при этом белковая молекула будет обладать более высокой электрофоретической подвижностью. Например, при введении трипсина с ИЭТ 10,1 в качестве растворителя можно использовать физиологический раствор или еще лучше буферный раствор с pH 4—5. С другой стороны, при выборе растворителя необходимо знать pH стабильности фермента, который часто не соответствует pH-оптимуму действия. Так, точка максимальной устойчивости для трипсина находится при pH 2,3, а для химотрипсина — при pH 3—3,5, а pH-оптимум действия для двух протеиназ лежит при pH 7—8.

При повышении pH среды происходит автолиз этих ферментов, который особенно выражен при pH свыше 8, при этом белок денатурируется с потерей энзиматической активности.

Инактивацию протеиназ в щелочной среде следует учитывать при проведении электрофореза с лечебной целью. Некоторые авторы (И. Н. Сосин, 1973) предлагают вводить 2% раствор трипсина с катода, используя в качестве растворителя 1% раствор соды. Однако в этих условиях pH среды составляет 8, фермент приобретает свойства катиона и передвигается к отрицательному полюсу. Кроме того, как показали наши опыты (рис. 6), трипсин в 1% растворе бикарбоната натрия при температуре 35° С за 30 мин теряет 80% активности, а за 60 мин практически полностью инактивируется.

В предварительных опытах, предшествующих электрофорезу, необходимо также проверить влияние гальванического тока на активность используемого энзима. Кроме того, нужно помнить, что ряд катионов и анионов влияют на биологическую активность ферментов. Например, активность ДНК-азы тормо-

зится хлористым натрием, а ионы магния или марганца активируют фермент.

Таким образом, применению электрофореза ферментов должны предшествовать тщательные исследования, включающие: установление полярности, выбор растворителя и концентрации фермента. В некоторых современных пособиях по лекарственному электрофорезу встречаются необоснованные рекомендации, касающиеся выбора полярности и растворителя. Например, в монографии В. С. Улащик (1976) «Теория и практика лекарственного электрофореза» трипсин рекомендуется вводить с катода в боратном буфере без указания pH раствора (с. 168). В другом месте этой монографии на с. 148 полярность обозначается как ± (?).

Важной и нерешенной проблемой электрофореза ферментов является выяснение возможности проникновения белковых молекул с молекулярной массой в тысячи раз большей, чем неорганических ионов, в пораженную ткань через кожу и слизистую оболочку. Лишь при воспалении (повышении сосудистой проницаемости) могут создаваться условия для проникновения ферментов с помощью гальванического тока. Трудную задачу представляет собой количественное определение в тканях вводимых с помощью постоянного тока ферментов, поскольку их концентрация при этом незначительна.

Необходимо учитывать также, что ферменты быстро связываются с белками тканей, которые резко снижают их энзиматическую активность.

Другая новая область энзимофизиотерапии — применение ингибиторов ферментов в отоларингологии. Ингибиторы протеолитических ферментов показаны при тех патологических процессах, в генезе которых лежит активация протеолиза и фибринолиза.

В ЛОРклинике до настоящего времени практически используется только ε-АКК в качестве препарата, тормозящего процессы фибринолиза, а также как антиаллергическое средство.

Большие перспективы открываются при применении природных ингибиторов, которые в отличие от синтетических обладают более широким спектром действия: они подавляют активность многих протеолитических ферментов, активирующихся при ряде воспалительных и аллергических процессов. В частности, при реакции антиген — антитело освобождаются протеолитические ферменты, которые катализируют образование кининов (К. Н. Веремеенко, 1974, 1977).

Так как ингибиторы имеют белковоподобную природу, перед

введением необходимо выяснить их полярность и электрофоретическую подвижность в различных растворителях. Поскольку выпускаемые препараты содержат примеси других неактивных белковоподобных соединений, которые могут изменять электрофоретические свойства, клиническому применению предшествовали биохимические исследования ингибиторов протеиназ. Как видно из рис. 7, при растворении ингибиторов в физиологическом растворе (pH 6) пантрипин электрофоретически гетерогенен, он состоит из нескольких фракций, движущихся в сторону как анода, так и катода. Контрикал разделяется при электрофорезе на две катодные фракции; трасилол передвигается к катоду в виде одной фракции. Возникает вопрос, где

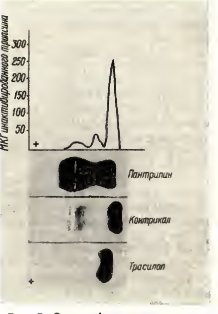


Рис. 7. Электрофореграммы природных ингибиторов протеолитических ферментов.

же находится активная фракция? Мы предлагаем определять специфическую ингибиторную активность во всех фракциях по их способности тормозить активность протеиназ. Опыты показали, что основная часть ингибирующей активности (примерно 90%) содержится в быстрой катодной фракции, в анодной фракции активность ингибитора не обнаружена.

На основании этих опытов можно сделать вывод о том, что ингибитор следует растворять в физиологическом растворе и вводить с положительного полюса.

Ингибиторы можно применять для лечения ряда аллергических и воспалительных заболеваний ЛОРорганов путем назального электрофореза. Учитывая дефицит препаратов ингибиторов, а также необходимость использования больших дозировок при парентеральном введении, в терапии регионарных воспалительных и аллергических процессов более целесообразно и экономически выгодно вводить ингибиторы непосредственно в очаг поражения с помощью постоянного тока (гальванический ток не влияет на активность ингибиторов). Так могут быть созданы более высокие концентрации ингибиторов в пораженных тка-

ях, особенно при повышенной проницаемости слизистых оболочек, наблюдающейся при воспалительных и аллергических реакциях.

Приведенные материалы показывают, что успех ферментной физиотерапии в существенной мере зависит от знания физико-химических свойств используемых энзимов, а также возможности проникновения экзогенных ферментов в очаг поражения, длительности их пребывания и выведения их организма. Здесь еще много неясных вопросов, которые могут быть разрешены клиницистами совместно с физиотерапевтами, биохимиками, фармакологами, физиологами. Необходимо внедрение новых методов количественного определения ферментов в тканях, включая применение флюорохромированных ферментов, флюорохромированных антител, а также радиоактивных индикаторов для прослеживания вхождения ферментов в клетки и определения их активности в пораженных тканях.

Среди физических методов терапии ферментами ЛОРзаболеваний наряду с электрофорезом важное значение имеет введение энзимов и их ингибиторов с помощью ингаляций их аэрозолей. Использование ферментов путем ингаляций аэрозолей основано на том, что они могут непосредственно взаимодействовать со специфическими субстратами очага повреждения и вызывать их расщепление.

Методы электрофореза и ингаляций аэрозолей ферментов нашли применение в терапии заболеваний ЛОРорганов — ларингитов, ринитов, воспалений полости рта и глотки, стенозирующих ларинготрахеитов, бронхитов у детей и т. д.

ФЕРМЕНТЫ В ТЕРАПИИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛОРОРГАНОВ

В комплексном лечении ряда заболеваний ЛОРорганов наибольшее распространение получили гидролитические ферменты, действующие на основные биологические субстраты, содержащиеся в патологическом очаге: белки, нуклеиновые кислоты, мукополисахариды. Среди них одно из ведущих мест принадлежит протеолитическим ферментам. Наряду с ними в клинической практике используются препараты мукополисахаридаз (гиалуронидаза, лизоцим) и нуклеаз (РНК-аза, ДНК-аза).

Широкое применение нашли протеолитические ферменты в комплексном лечении острых ларинготрахеобронхитов у детей. Это жизнеопасное заболевание сопровождается закупоркой дыхательных путей гнойно-некротическими слепками и корка-

ми, иногда с трудом удаляемыми механическими способами даже через трахеотомическое отверстие. Протеолитические ферменты включают в комплекс лечебных средств при этом заболевании как высокоактивные биологические вещества, обладающие выраженными некролитическими свойствами, потенцирующие действие антибиотиков и снижающие устойчивость микрофлоры к последним (К. Н. Веремеенко, 1967, 1971; Я. К. Богуш и Л. Я. Шварцман, 1970; В. И. Стручков и др., 1970).

Первая публикация о применении трипсина при подсвязочном ларингите у детей младше 5 лет относится к 1956 г. Lames и Clausse использовали аэрозоль трипсина с антибиотиками в лечении 13 детей в возрасте до 5 лет. Разжижая вязкую слизь, трипсин облегчает ее эвакуацию, улучшая тем самым дыхание, что позволило у большинства детей избежать трахеотомии. Детям, подвергшимся трахеотомии, раствор трипсина закапывали через трубку в дыхательные пути каждые 2—3 ч, что позволило деканюлировать их в более ранние сроки, чем детей, не получавших такого лечения. Jasper (1964) считает, что введение через трахеотомическую трубку раствора трипсина (5 мг в 25 мл физиологического раствора) способствует быстрому удалению пленок через 1—3 мин из ее просвета (данные 100 наблюдений): ингаляции аэрозолей трипсина облегчали откашливание мокроты и ускорили выздоровление 169 больных сухим ларинготрахеитом.

По данным В. С. Черного (1974), при воздействии трипсина и химотрипсина на гнойный экссудат уже через 15 мин вязкость последнего уменьшается в 2 раза, а через 2 ч — более чем в 10 раз. Кроме того, протеиназы в малых концентрациях (0,125 мг/мл) усиливают динамическую функцию мерцательного эпителия. Эти исследования послужили основанием для включения протеиназ в комплексное лечение 265 детей с ларинготрахеобронхитами, сопровождавшимися стенозом различной степени. Из них до 1 года было 78 детей, от 1 до 2 лет — 108, старше 2 лет — 79.

Протеолитические ферменты применяли в виде внутримышечных инъекций (лиофилизированные препараты протеиназ по 2,5 мг 2 раза в день) и местно в ингаляциях из расчета 2,5 мг 1 раз в сутки. Стеноз снимался в первые двое суток, улучшалось общее состояние; детей выписывали из клиники, в зависимости от тяжести исходного состояния, в сроки от 3—5 дней до 3 нед (И. А. Курилин соавт., 1975).

Е. А. Евдощенко (1976) рекомендует включать протеолитические ферменты (2 мг химотрипсина в 1 мл физиологического

раствора) в состав аэрозольной противоотечной смеси для ингаляций при острых ларинготрахеобронхитах у детей и стенозе I—II степени. Раствор химотрипсина в смеси с антибиотиками, аскорбиновой кислотой и 5% новокаином вливают в трахею и бронхи (с последующим отсасыванием) при прямой ларингоскопии под общим наркозом у детей со стенозом III степени — это важный элемент комплексной неотложной терапии, позволяющей вывести ребенка из угрожающего состояния и избежать в большинстве случаев трахеотомии. Salerno (1960) отметил благоприятное влияние трипсина на выздоровление больных в острой и подострой фазах ларингита при отсутствии его существенного эффекта при хроническом течении заболевания.

Г. В. Терентьев (1964), А. Г. Лихачев (1965), Lemoyene (1966) использовали протеиназы в лечении воспалительных заболеваний околоносовых пазух носа, главным образом верхнечелюстных и лобных. Большинство авторов считают целесообразным водить раствор фермента в околоносовые пазухи носа вместе с раствором антибиотика, что повышает лечебный эффект каждого из них и ускоряет выздоровление. Протеолитические ферменты, облегчая удаление некротических масс, способствуют более тесному контакту антибиотиков со слизистой оболочкой пазух, а также уменьшают отек последней. De Dobbeleer (1962) вводил в пазухи 18 больных хроническим гайморитом химотрипсин в сочетании с антибиотиком, подобранным с учетом чувствительности флоры. Для полного излечения 11 из них потребовалось от 2 до 12 пункций. Jasper (1964) лечил таким способом 50 больных острым и хроническим гайморитом и уже после первых пункций отметил заметное уменьшение количества отделяемого, уменьшение или прекращение головных болей, снижение температуры в остром периоде заболевания. Все больные были излечены без оперативного вмешательства, причем в течение 5 мес рецидивов не наблюдалось ни в одном случае. Kustra и соавторы (1958) отметили положительное действие (по 5 мг через день) трипсина, применяемого местно при хронических синуитах, ранее безуспешно леченных, у 12 больных из 15 (у 6 — выздоровление, у 6 — улучшение).

В Киевском НИИ отоларингологии впервые проведены эксперименты по обоснованию применения протеиназ для лечения хронических гайморитов (К. Н. Веремеенко, 1963). В опытах in vitro было исследовано действие кристаллических препаратов трипсина и химотрипсина в отдельности и их сочетания на экссудаты из верхнечелюстной полости. Экссудат гнойный или слизисто-гнойный брали при пункции гайморовой полости у больных.

Вначале была изучена расщепляемость экссудата из полости различными концентрациями трипсина и химотрипсина (рис. 8). При концентрации фермента 0,5—2 мг/мл наблюдалась прямая зависимость между скоростью гидролиза белков экссудата и количеством протеиназ. При дальнейшем повышении концентрации фермента кривая отклонялась от прямой зависимости. Основываясь на этих опытах, мы считаем, что концентрация фермента 1 мг/мл является оптимальной для воздействия на экссудат верхнечелюстной полости. Поэтому мы применяли ее в дальнейшем.

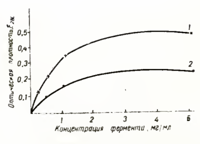


Рис. 8. Гидролиз экссудата из верхнечелюстиой полости различиыми концентрациями трипсина (1) и химотрипсииа (2).

В следующих опытах было изучено действие трипсина и химотрипсина в отдельности и их сочетания на экссудат из верхнечелюстных полостей (табл. 30). В опытах, где изучалось действие ферментов в отдельности, концентрация их составляла 1 мг/мл, а в опытах при их сочетании — по 0,5 мг/мл каждого.

Как видно из табл. 30, расщепляемость образцов экссудатов протеиназами неодинакова, что зависит, вероятно, от характера экссудата и количества белков, присутствующих в нем. В 4 опытах химотрипсин был более эффективным, чем трипсин. Смесь трипсина и химотрипсина в дозах по 0,5 мг/мл каждого оказывала в 4 из 6 случаев большее гидролизующее действие на экссудат, чем концентрации 1 мг/мл каждого из них. Эти ферменты действуют на различные пептидные связи в белковой молекуле, усиливая протеолитическую активность друг друга, что соответствует результатам, полученным нами ранее при изучении противовоспалительного действия протеиназ

Таблица 30. *Расщепление экссудата из верхнечелюстных полостей протеиназами*

Образцы экссудатов	Оптическая плотность (E_{280})		
	Трипсин 1 мг/мл	Химотрипсин 1 мг/мл	Смесь ферментов по 0,5 мг/мл каждого
1-й	0,13	0,19	0,30
2-й	0,28	0,66	—
3-й	0,16	0,29	0,32
4-й	0,13	0,10	0,15
5-й	0,35	0,14	0,32
6-й	0,30	0,52	0,41
7-й	0,33	0,32	0,32

в опытах на животных (К. Н. Веремеенко, 1962).

Известно, что кровь и различные ткани содержат ингибиторы, которые связывают протеолитические ферменты и препятствуют их действию. Поэтому не исключалась возможность, что белки, содержащиеся в полости, могут угнетать активность ферментов. Для выяснения этого вопроса были проведены следующие опыты. К определенному количеству раствора химотрипсина (концентрация 1 мг/мл) добавляли равное по объему количество экссудата (опытная проба). Смесь выдерживали 15 мин при комнатной температуре. В контрольной пробе к раствору фермента добавляли равное по объему количество физиологического раствора. Оказалось, что количество фермента, выявляемого в опытной и контрольной пробах, было одинаковым, т. е. в экссудате из верхнечелюстной полости отсутствовали вещества, угнетающие протеолитическую активность химотрипсина.

Таблица 31. *Количество химотрипсина, определяемое после его введения в верхнечелюстную полость.*

Образцы экссудатов	Количество введенного фермента, мг	Количество химотрипсина в 1 мл экссудата, мг	
		Сразу после введения	Через 30 мин
1-й	2,5	0,60	0,45
2-й	3,3	0,79	0,70
3-й	5	1,20	1,22
4-й	5	1,14	1,00

Нами было установлено, что в 6 образцах экссудата из верхнечелюстной полости pH колебался от 7 до 8, в 3 образцах — от 5,6 до 6,2. Так как оптимум действия трипсина и химотрипсина составляет pH 7—8 при реакции среды ниже указанных величин, необходимо вводить фермент, растворенный не в физиологическом растворе, а в буфере с pH 7—8. Если же нет возможности определить pH содержимого полости, то фермент следует вводить в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5.

Для установления времени действия фермента в верхнечелюстной полости 4 больным после промывания пазух физиологическим раствором вводили различные количества химотрипсина в 1 мл физиологического раствора. Непосредственно после введения фермента и через 30 мин производили отсасывание содержимого верхнечелюстной полости и в нем определяли протеолитическую активность химотрипсина. Содержание химотрипсина, обнаруживаемое сразу и через 30 мин после его введения, в 1 мл экссудата практически одинаково (табл. 31).

После проведенных биохимических исследований ферменты начали применять в клинике. Трипсин и химотрипсин использо-

вали в сочетании с антибиотиками стрептомицином и левомицетином, которые совместимы с этими ферментами.

Г. В. Терентьев (1964) использовал растворы кристаллического трипсина и химотрипсина для лечения 63 больных хроническим гайморитом (48 — гнойным и 15 — катарально-серозным). Большинство из них ранее упорно и безуспешно лечились консервативно в течение 3—4 лет. Введению фермента предшествовала диагностическая пункция для определения характера экссудата, микрофлоры и чувствительности ее к антибиотикам. В пазуху, после ее промывания, вводили ежедневно приготовленную ex tempore смесь антибиотика и раствора фермента (5 мг на 1 мл физиологического или буферного раствора с pH 7,5). Результат лечения контролировали клинически, рентгенологически и морфологически — по количеству эмигрировавших лейкоцитов в промывных водах (метод Ясиновского). Уже после 2—3 введений фермента и антибиотика улучшалось общее состояние больных, уменьшались головные боли и количество выделений из носа, гнойный характер их сменялся серозным, а при катаральном гайморите отделяемое исчезало на 2—3-й день. Лечение прекращалось при нормализации всех исходных данных и уменьшении эмиграции лейкоцитов до 2—3 в 1 мл промывной жидкости. Такой результат достигался уже на 3—4-й день лечения, в то время как при введении одних антибиотиков без фермента — лишь на 7—8-й день. В течение 2 лет наблюдались 43 больных из 63. Рецидив отмечен у 14 из них, остальные были излечены полностью.

Р. Д. Карал-Оглы (1973), чтобы избежать повторных пункций верхнечелюстных пазух, вводил в полость растворы ферментов с антибиотиком или без него (при явлениях непереносимости) через хлорвиниловую трубку, вставленную в полость на 10 дней. Без удаления экссудата невозможно излечить ни острый, ни хронический гайморит, но дети и их родители относятся к пункциям, тем более повторным, отрицательно. В таких случаях применяют дренажный метод лечения.

Е. А. Евдощенко (1973, 1974, 1976) использует для дренирования тефлоновые трубочки, вводимые в верхнечелюстную пазуху через иглу Куликовского и оставляемые до полной санации пазухи. При наличии густого гнойного экссудата удаление его затруднено, к тому же он закупоривает дренажную трубку. В этих случаях Е. А. Евдощенко и Н. Я. Лекарева (1976) вводят в пазуху от одного до нескольких раз в день, наряду с антибиотиками и гидрокортизоном, протеолитические ферменты — химотрипсин, химопсин, трипсин в количестве 5 мг в 1 мл физиоло-

гического раствора. Полное выздоровление у 99,5% детей с экссудативным гайморитом наступало через 7—20 сут.

При острых и хронических воспалениях лобной пазухи протеолитические ферменты также значительно повышают лечебный эффект антибиотиков. Lemoyene (1964) вводил в лобную пазуху вначале растворы кристаллического трипсина путем трепанопункции на 12—24 ч, затем — раствор трипсина и антибиотиков, что способствовало восстановлению проходимости лобноносового канала и естественной эвакуации отделяемого. Эту методику использовал Р. Д. Карал-Оглы (1968) для лечения 65 больных острым и хроническим фронтитом, в том числе 12 — с аллергическим компонентом. Всего им сделано 80 трепанопункций, при которых в пазуху вводили канюлю на 4—7 дней; 2—3 раза в день через канюлю вводили по 10—15 мг фермента (трипсина, химотрипсина, химопсина) в 2—3 мл физиологического раствора вместе с антибиотиком. Осложнений при этом не наблюдалось. Клиническое выздоровление наступило у 56 человек, улучшение — у 7, эффекта не отмечено у 2. В период от 3 до 12 мес рецидив воспаления наблюдали у 3 больных.

В лечении воспалений носа и околоносовых пазух, миндалин кроме протеолитических ферментов нашел применение лизоцим, обладающий антимикробным действием (А. Г. Лихачев и Б. Г. Либман, 1973; Covallo, 1960). Лизоцим применяется местно — на тампонах, а также в виде вливаний и ингаляций аэрозоля. Последний способ используется для разжижения мокроты, снятия отека слизистой оболочки при воспалениях дыхательных путей. А. Г. Лихачев и Б. Г. Либман (1973) использовали фермент для лечения трепанационных ран и добились ускорения репаративных процессов и эпителизации.

В. М. Лосицкая и соавторы (1973) доказали в опытах in vitro целесообразность сочетанного применения протеиназ и лизоцима.Трипсин и химотрипсин расщепляют белки, а лизоцим — мукополисахариды, придающие секрету слизистых оболочек мукоидный характер. Изучая совместное действие этих ферментов на гнойный экссудат из верхнечелюстных пазух, авторы установили, что трипсин повышает активность лизоцима, а химотрипсин тормозит ее. Эти данные указывают на целесообразность применения трипсина в сочетании с лизоцимом при лечении воспалений околоносовых пазух носа и наличии слизисто-гнойных выделений (К. Н. Веремеенко и соавторы, 1974).

При воспалениях ЛОРорганов, особенно с выраженным аллергическим компонентом и отеком слизистых оболочек, А. И. Коломийченко и соавторы (1971) предложили использовать местно мочевину с тиосульфатом натрия. А. Л. Маркзицер

(1974) для усиления действия мочевины предложил вводить уреазу, которая расщепляет ее на углекислый газ и аммиак, что значительно подщелачивает гнойное содержимое. Для лечения 59 больных острым или обостренным хроническим гнойным гайморитом применяли смесь мочевины с уреазой, а при наличии показаний ее использовали совместно с антибиотиками, антигистаминными препаратами или УВЧ. Лечебной смесью промывали полость через пункционную иглу вначале через день, затем реже. На одно промывание расходовалось 100 мл 15% раствора мочевины и 3 мл препарата уреазы. У больных острым синуитом выздоровление наступало после 3 пункций, при обострении хронического — после 6—7.

Важная область лечебного применения ферментов — экссудативные отиты с гнойным, мукозным и серозным отделяемым. Воспалительные процессы в полостях среднего уха сопровождаются скоплением экссудата в труднодоступных ячейках, карманах, ограниченных спайками, фибринозными пленками, мелких полостях и затрудненной его эвакуацией. При этом создаются очаги хронической инфекции, мало доступные местному воздействию медикаментов. Рубцы и спайки еще больше ограничивают эти очаги инфекции, резко ухудшая дренаж и аэрацию среднего уха.

В опытах in vitro было установлено, что трипсин и α-химотрипсин в концентрации 1—2 мг/мл хорошо расщепляют гнойный экссудат среднего уха и частично растворяют холестеатомные массы; коллагеновые волокна приобретают вид гомогенных масс с выраженной пикнофилией, некротизированные ткани гидролизуются полностью. Левомицетин (0,03 г) и стрептомицин (100 000 ЕД), добавленные к 1 мл трипсина и α-химотрипсина, не снижают активность последних, что позволяет использовать ферменты и антибиотики сочетанно (К. Н. Веремеенко, 1963). В. В. Дмитренко (1968) исследовал на 60 кроликах действие трипсина в сочетании с антибиотиками на течение экспериментального гнойного воспаления среднего уха. Наилучший лечебный эффект получен при сочетанном местном применении трипсина и бициллина-3. Фермент действует на все патологические ткани, кариозные участки кости, холестеатому, гнойный экссудат, не влияя на здоровые ткани. А. И. Коломийченко, К. Н. Веремеенко (1965) применяли ферменты для лечения 20 больных хроническим гнойным мезоэпитимпанитом, ранее длительно и безуспешно лечившихся консервативными способами. Местное применение раствора трипсина (1 мг/мл) в сочетании с промыванием среднего уха антисептиками через 8—10 дней приводило к снижению или прекращению гноетечения, нормализации сли-

зистой оболочки среднего уха. Наблюдение в течение 6—7 мес показало, что состояние уха оставалось хорошим. Такие же результаты получил А. Г. Лихачев (1965) при лечении химотрипсином больных гнойными средними отитами, среди которых преобладали эпитимпаниты, осложненные холестеатомой. Фермент не только разжижал гнойный экссудат, но и способствовал разрыхлению холестеатомы и удалению ее в виде крошковатых масс.

Для воздействия на рубцовую ткань Н. М. Меньшиков (1968) предложил применять местно ферменты протеолитического и гиалуронидазного действия — лидазу и ДНК-азу, а после них — трипсин и химотрипсин в сочетании с антибиотиками. Однако при гнойных средних отитах, в отличие от воспалительных заболеваний других ЛОРорганов, водные растворы лечебных веществ могут оказывать неблагоприятный побочный эффект, особенно при длительной задержке их в полостях уха. Это относится и к растворам протеолитических ферментов. Кроме того, водные растворы трипсина при pH 7—8 подвергаются автолизу и в течение 2 ч при температуре тела полностью инактивируются (К. Н. Веремеенко, 1963). В связи с этим К. Н. Веремеенко была разработана методика получения эмульгированных препаратов протеиназ. Растворы трипсина и α-химотрипсина в глицерине (1—2 мг на 1 мл) обладали высокой стабильностью в отличие от водных, полностью сохраняя свою активность в течение недели при 18—20° С; при температуре тела (36° С) и pH 7,6 эмульсии трипсина не теряли активности в течение 4 ч. Эмульсия протеиназ готовится из смеси глицеринового раствора фермента и антибиотика с вазелиновым маслом в отношении 1 : 1. В 1 г эмульсии содержится 2 мг кристаллического фермента и 100 000 ЕД стрептомицина или 0,03 г левомицетина. Эмульсия, приготовленная путем тщательного размешивания при pH 7,6, хорошо сохраняется в течение недели при температуре 3—5° С.

Для лечения отитов с аллергическим компонентом к эмульсии добавляют гидрокортизон из расчета 0,05—0,1 мл (1,25 — 2,5 мг) на 1 мл эмульсии. Гидрокортизон не снижает активности фермента, входящего в состав эмульсии.

Местному лечебному применению эмульсии (как и любого другого препарата) должны предшествовать санация носа и носоглотки (при наличии показаний) и удаление полипов и грануляций из среднего уха. При этой операции местное анестезирующее действие 2—3% раствора дикаина значительно усиливается, если к 1 мл его добавить 32 ЕД лидазы, которая, деполимеризуя соединительнотканные образования, способствует

лучшему проникновению дикаина в ткань (К. Н. Веремеенко и соавт., 1968).

Лечение эмульсией (с гидрокортизоном или без него, по показаниям) проведено 105 больным хроническим гнойным воспалением среднего уха в возрасте от 15 до 65 лет. Давность заболевания была от 1 до 25 лет. У 68 из них определялась холестеатома, у 16 — полипозные изменения слизистой оболочки. Все больные ранее лечились различными консервативными методами, но эффект в лучшем случае был кратковременным (К. Н. Веремеенко и соавт., 1969). Лечение эмульгированными препаратами проводили амбулаторно. Препарат, подогретый до 36° С, вводили в среднее ухо после тщательного безводного туалета с помощью шприца с канюлей Гартмана через перфорацию барабанной перепонки, при эпитимпанитах — в аттик. Больного укладывали на здоровую сторону со слегка запрокинутой головой. В этом положении с помощью воронки Зигле несколькими нажатиями баллона эмульсию продвигали в лежащие глубже отделы среднего уха, затем вход в ухо закрывали ватным шариком, пропитанным эмульсией. Процедуру повторяли 2—3 раза в неделю. Курс лечения составлял в среднем 10—15 процедур, лишь в отдельных случаях — до 30. Побочных явлений и осложнений не было ни в одном случае. Сразу после лечения гноетечение прекратилось у 83 больных, у 19 — значительно уменьшилось. Трем предложена общеполостная операция ввиду отсутствия эффекта. В отдаленные сроки (от 1 до 5 лет) наблюдали 86 больных, из которых гноетечение возобновилось у 17, но после 5—6 введений эмульсии стойко прекратилось у 11. Положительный результат такого лечения К. Н. Веремеенко и соавторы (1969) объясняют не только тем, что протеолитические ферменты, расщепляя и разжижая некротические массы, способствуют их удалению и лучшему контакту антибиотиков с пораженными тканями, но и способностью ферментов разрушать некоторые бактериальные токсины (Cleeland, Sugg, 1963) и оказывать противоотечное действие.

Для консервативного лечения гнойных отитов, стимуляции заживления трепанационных ран используют и другие ферменты: лизоцим (А. Г. Лихачев, 1973; З. Ш. Шаихов и соавт., 1979), уреазу в смеси с мочевиной (А. Л. Маркзицер, 1974).

Протеолитические ферменты применяют также при консервативном лечении латентных отоантритов у детей. Это тяжелое заболевание развивается обычно у детей грудного возраста, ослабленных, недоношенных, находящихся на искусственном вскармливании, перенесших тяжелое соматическое заболевание. При наличии закрытого очага инфекции антибиотикотерапия не

дает должного эффекта. Поэтому у детей с латентным отоантритом даже длительное введение массивных доз антибиотиков, к которым чувствительна флора, часто не оказывает предполагаемого лечебного эффекта без удаления гнойного экссудата из антрума. Однократной же антропункции, даже с промыванием антрума физиологическим либо антисептическим раствором и введением антибактериального препарата, недостаточно, и эту процедуру приходится повторять несколько раз, что не только тяжело и мучительно, но и не всегда обеспечивает своевременное удаление накапливающегося между пункциями экссудата (Е. А. Евдощенко, М. А. Мельник, 1976). Наиболее щадящим и в то же время эффективным является консервативно-хирургический метод дренирования антрума с помощью тефлонового дренажа (Е. А. Евдощенко, М. А. Мельник, 1976), через который проводят ежедневные промывания полостей среднего уха антибактериальными препаратами. Добавление к ним протеолитических ферментов способствует расщеплению и более полной эвакуации гнойного отделяемого, ускоряет лечение и повышает его эффективность. Использовав этот метод в сочетании с парентеральным введением антибиотиков и общеукрепляющими мерами в лечении 54 детей с отоантритом (у 47 — двусторонним), авторы смогли излечить без антротомии 43.

С большими трудностями встречаются отоларингологи при лечении хронических катаральных отитов. В течении этого заболевания можно выделить две основные стадии: образования серозного секрета и образования геля (так называемого «клейкого уха»). Хронические катаральные отиты — заболевание очень частое: так, например, Harrison, Watson (1969) обнаружили гиперсекреторный отит у 3,6% детей пятилетнего возраста среди более чем 1700 обследованных. Л. В. Авраменко и соавторы (1971) приводят данные о том, что катаральные отиты являются причиной тугоухости у 25% плохо слышащих людей.

Первые описания отдельных наблюдений «клейкого уха» относятся к 50—60 гг. (В. А. Гукович и др., 1963; Siirara и соавт., 1952, 1954; Bauer, Wodak, 1961). Высказывались различные соображения о причинах, характере и источнике образующегося секрета. Одни авторы считали его транссудатом, возникающим вследствие выпотевания плазмы через стенки кровеносных сосудов, отека слизистой оболочки и стаза, развивающихся при нарушении вентиляционной функции слуховой трубы; большинство же авторов разделяли точку зрения Friedman (1963) и других, что серозное либо гелеобразное содержимое среднего уха представляет собой экссудат. Palva, Raunio (1975) подтвердили, что при секреторных отитах секрет образуется патологически

измененными клетками слизистой оболочки среднего уха в условиях обструкции слуховой трубы: содержание белков в пунктатах из среднего уха было намного выше, чем в сыворотке крови.

Основными факторами, обусловливающими возникновение и течение катарального отита, являются: острые и хронические воспалительные заболевания носа и глотки, вызывающие явления длительного застоя и нарушение проходимости слуховой трубы, наличие микрофлоры в среднем ухе и изменение реактивности макроорганизма. Имеет значение также нерациональное применение антибиотиков, особенно в сочетании с недостаточно активным лечением (И. И. Гольдман, Н. А. Преображенский, 1970).

Предложено много методов лечения хронических секреторных отитов, основанных на представлении авторов об этиологических и патогенетических факторах. Среди них были консервативные, включавшие применение антибактериальных препаратов, физических методов и др., и хирургические (парацентез, тимпанотомия, шунтирование). Однако результаты были часто неудовлетворительные ввиду большой частоты рецидивов. Palva и Raunio (1975) считают, что поскольку слизистая оболочка среднего уха активно выделяет много белковых веществ в полость, одним парацентезом и отсасыванием экссудата нельзя получить стойкого результата.

Данные о высоком содержании белков в отделяемом среднего уха при экссудативных отитах послужили основанием к применению ферментов протеолитического действия в лечении этого заболевания. Coyas (1963) сообщил о благоприятном действии химотрипсина при лечении катаральных отитов у детей. Автор сочетал транстимпанальное введение 0,7 мл раствора фермента в концентрации 1:5000 в полость среднего уха с внутримышечными инъекциями по 2 мг в течение 5 дней. У всех детей, ранее безуспешно леченных антибиотиками, наступило стойкое улучшение слуха. Рубцовые процессы хуже поддавались лечению, давая лишь временное улучшение слуха.

В Киевском НИИ отоларингологии протеолитические ферменты (трипсин, α-химотрипсин) применяются с 1962 г. для лечения гиперсекреторных и адгезивных отитов (К. Н. Веремеенко, 1963; А. И. Коломийченко, К. Н. Веремеенко, 1965; Л. В. Авраменко и соавт., 1966, 1969; Л. А. Зарицкий и соавт., 1969). Ферменты в концентрации 1:1000 вводили через слуховую трубу после продувания, транстимпанально либо комбинированно. Пункции барабанной перепонки производили 1 раз в 3 дня, на курс — 3—5 пункций; через трубу раствор фермента вводили

ежедневно (кроме дней, когда делается пункция), на курс — 10—15 введений; после каждого введения препарата (любым путем) через 15—20 мин производили массаж барабанной перепонки и продувание трубы. Достоверное улучшение слуха, прекращение или уменьшение шума в ушах отмечено у 35 из 50 больных адгезивными отитами (Л. В. Авраменко, 1966). При гиперсекреторных отитах такое лечение дает эффект во всех случаях, но его необходимо периодически повторять, при рецидивах достаточно провести $^1/_2$ и даже $^1/_4$ курса, чтобы наблюдалось длительное улучшение слуха.

При спаечных процессах в среднем ухе применяют химотрипсин (Л. В. Егорова, Т. Н. Родионова, 1973). Вначале раствор фермента вводили только транстимпанально в концентрации 1 мг в 0,5 мл физиологического раствора через день, в среднем 3 пункции на курс; затем химотрипсин вводили через слуховую трубу как транстимпанально, так и в виде аэрозоля в концентрации 5 мг в 2,5 мл ежедневно в течение недели. Авторы сочетали инстилляции фермента с вибромассажем барабанной перепонки и продуванием труб. Транстимпанальный метод дал положительный результат, заключавшийся в улучшении слуха разной степени в 51 наблюдении из 56, а транстубарный — в 39 из 53, преимущественно при экссудативных отитах. На основании своего опыта авторы рекомендуют начинать введение ферментов при экссудативных отитах транстубарно, а при адгезивных — транстимпанально. Подобные же наблюдения за результатами лечения 36 больных экссудативными отитами вливанием протеолитических ферментов через слуховую трубу либо через барабанную перепонку приводят З. Н. Буракова и Л. А. Берестецкая (1974). Aubry, Causse, Pailer (1960) отметили хорошее литическое действие химотрипсина на вязкие гелеобразные экссудаты в среднем ухе при транстимпанальном введении.

Litton, McCabe (1962) в опытах in vitro установили, что химотрипсин в концентрации 5000 ЕД в 1 мл значительно уменьшает вязкость густого геля из среднего уха. Corone (1959) считает наиболее эффективным способом лечения спаечных и слипчивых туботимпанитов введение в среднее ухо смеси гидрокортизона и химотрипсина. Эта смесь, к которой при необходимости добавляют антибиотик с учетом чувствительности флоры, с успехом применяется и в настоящее время для лечения серозных и адгезивных отитов. Так, М. К. Катиленков (1974) лечил 25 больных экссудативным средним отитом с давностью от 1 мес до 3 лет в возрасте от 5 до 50 лет. У всех отмечалось резкое ограничение или отсутствие подвижности барабанной перепонки, плохая проходимость слуховых труб. На фоне общего лечения

и физиотерапии автор проводил 6—10 катетеризаций слуховых труб с помощью мочеточникового катетера, введенного через металлический, при которых среднее ухо заполнялось смесью гидрокортизона (15—20 ЕД) и химотрипсина (0,5 мг на 1 мл). У всех больных слух восстановился практически до нормы (5—6 м шепотной речи), улучшилась подвижность барабанных перепонок и проходимость труб.

У некоторых больных экссудативными отитами в барабанной полости скапливается густое гелеобразное содержимое, которое даже после обработки протеолитическими ферментами трудно удалить отсасыванием через барабанную перепонку. В этих случаях приходится прибегать к мирингатомии для его механического удаления и последующего лечения через дренаж.

Mawson (1967) произвел мирингтомию с последующим отсасыванием, введением α-химотрипсина и «обратным продуванием» с помощью баллона Политцера со стороны слухового прохода — с целью воздействия на патологически измененную слуховую трубу у 63 больных (у 9 в ухе был серозный экссудат, у 54 — густой «гель»). Положительный эффект получен в 76% случаев, отдаленные результаты не приводятся. Однако в дальнейшем автор ограничивался отсасыванием геля после мирингатомии и введением α-химотрипсина — в ряде случаев через пистон для постоянного дренажа. От «обратной политцеризации» он отказался после опубликования случая мгновенной смерти при подобной процедуре вследствие проникновения воздуха через дегисценции в tegmen tympani и сдавления мозга (Ahren, Thulin, 1965), тем более, что, исследовав 94 височных кости, авторы нашли значительные дефекты в верхней стенке аттика в 20% случаев.

Эффективность метода местной ферментотерапии экссудативных отитов снижает сравнительно короткий период действия ингредиентов, входящих в состав лечебной смеси: фермент быстро инактивируется, а жидкость вытекает через слуховую трубу. Поэтому может представить интерес опыт Wiegand (1963), предложившего готовить смесь из фермента и антибиотиков на основе целлюлозометилового эфира и заполнять ею полость среднего уха. В течение нескольких минут введенная жидкость превращалась в желеобразную пломбу, которая затем медленно растворялась, постепенно высвобождая лечебные вещества. Этим способом автор вылечил 21 больного хроническим гиперсекреторным отитом, ранее безуспешно лечившихся различными методами. Перспективным является применение иммобилизованных (связанных) ферментов в отиатрии вообще и в лечении экс-

судативных отитов в частности (К. Н. Веремеенко, Г. Ф. Карпенко, 1979).

Протеолитические ферменты при воспалительных заболеваниях ЛОРорганов можно применять местно, парентерально и с помощью электрофореза. Parsons (1958) вводил по 5000 ЕД химотрипсина 1—2 раза в неделю внутримышечно 60 больным синуитами и ринитами и уже в первые дни отмечал улучшение носового дыхания, разжижение и свободное отхождение секрета. Auslander (1958) с успехом применил внутримышечные инъекции трипсина — 5 мг в 1 мл сезамного масла (так называемый паренсим) — в лечении 106 больных острым воспалением среднего уха. Курс лечения продолжался 5 дней, в течение которых вводили по 2,5 мг препарата 2 раза в день. Среди больных этой группы прибегали к мирингатомии значительно реже, чем среди больных, не получавших протеолитических ферментов.

Комплексное лечение различных заболеваний предусматривает также введение ферментов с помощью физических факторов.

В Киевском НИИ отоларингологии применяется электрофорез протеолитических ферментов как важный элемент комплексного лечения хронических секреторных и адгезивных отитов. Ферменты вводят с помощью гальванического тока и токов Бернара (диадинамических токов). Такой способ обеспечивает доставку фермента непосредственно в locus morbi и усиливает его действие рефлекторным влиянием электрического тока, механическим эффектом (микровибрации), если используются диадинамические токи. Для эндаурального электрофореза фермента наружный слуховой проход от барабанной перепонки до активного электрода заполняется марлевыми турундами, пропитанными раствором фермента оптимальной концентрации. При введении фермента методом электрофореза обычно не отмечается местных и общих аллергических реакций, возникающих в ряде случаев при парентеральном их применении из-за антигенных свойств ферментов, являющихся чужеродными белками. Подобные реакции, хотя и редко, но все же наблюдали отдельные авторы. Aurby и соавторы (1960) описали один случай аллергического отека языка и гортани после внутримышечных инъекций химотрипсина. Rorger и Pinson отмечали острую лабиринтную реакцию после введения химотрипсина в среднее ухо, хотя она могла быть результатом действия не самого фермента, а высокой или низкой температуры его раствора, т. е. являлась не аллергической, а калорической реакцией лабиринта. Depaege (1962) сообщил о случае сенсибилизации к химотрипсину, введенному транстимпанально.

Препараты протеолитических ферментов используются не только в комплексе консервативных лечебных методов при воспалительных заболеваниях ЛОРорганов. Они — эффективное средство, облегчающее действия хирурга при ряде операций по поводу спаечных процессов, в особенности в среднем ухе. По мнению Bouche и соавторов (1960), применение химотрипсина для размягчения спаек и шварт в барабанной полости коренным образом изменило технику тимпанопластики.

Всем отохирургам знакомы трудности, с которыми сопряжено высвобождение слуховых косточек из спаек во время операций, проводимых по поводу адгезивных отитов, тимпаносклероза, при реоперациях у больных отосклерозом, у которых первоначальный функциональный эффект был нивелирован вторичной иммобилизацией слуховых косточек образовавшимися при организации спаек сгустками крови.

Раствор трипсина (5 мг на 5 мл физиологического раствора) готовят во время операции, когда выясняется необходимость в его применении. Если в барабанной полости обнаруживаются мясистые розовые спайки в области окон лабиринта, вокруг слуховых косточек, между барабанной перепонкой и медиальной стенкой, барабанная полость заполняется раствором фермента на 10—15 мин, после чего избыток жидкости отсасывается и размягченные спайки удаляются. При необходимости орошение повторяется. Благодаря воздействию фермента спайки удаляются сравнительно легко и без большого кровотечения, что позволяет избежать их повторного образования в дальнейшем.

Causse (1959) впервые применил химотрипсин у 15 больных при тимпанопластике и у 2 — при операции по поводу адгезивного отита. Раствором химотрипсина в концентрации 5 мг на 5—10 мл физиологического раствора производилось орошение операционного поля до 3—4 раз, начиная с момента экспозиции барабанной полости. Химотрипсин оказывал быстрое литическое действие в течение 3—10 мин на синехии и фиброзную ткань, облегчая высвобождение от них косточек и окон лабиринта. Препарат не вызывал болевых ощущений, не оказывал побочного действия. По сообщению Bouche и соавторов (1960), фиброзные образования, окружающие слуховые косточки, удаляют с помощью химотрипсина очень легко: они размягчаются до такой степени, что удаляются с помощью отсасывателя. Beningasa (1962) для облегчения действия фермента предварительно с помощью насечек нарушал эпителиальный покров фиброзных спаек.

Все отохирурги, применявшие при операциях протеолитические ферменты, подчеркивают, что, растворяя спайки и синехии,

они не оказывают действия на нормальные ткани — мукопериост, суставные капсулы слуховых косточек, связочный аппарат среднего уха.

В Киевском НИИ отоларингологии протеиназы применяются при операциях на среднем ухе с 1962 г. Б. Л. Французов, К. Н. Веремеенко (1963) использовали химотрипсин в виде местных аппликаций у 50 больных при операции тимпанопластики для облегчения ликвидации фиброзных образований, высвобождения слуховых косточек и удаления эпидермиса с медиальной стенки полости.

Протеиназы, а также ферменты гиалуронидазного действия эффективны при местном применении во время реопераций при отосклерозе, когда причиной вторичного снижения слуха являются спайки, организовавшиеся фибрин и гранулемы (И. Л. Зарицкая, 1964; А. И. Коломийченко и соавт., 1965).

Применение ферментов в комплексе консервативных и хирургических методов лечения воспалительных заболеваний ЛОР-органов значительно повышает эффективность терапии, сокращает сроки лечения в амбулатории и стационаре, позволяет у многих больных, в частности адгезивными отитами, избежать операции, получив функциональный и морфологический эффект консервативным бескровным способом.

ФЕРМЕНТЫ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЛОРОРГАНОВ

В настоящее время имеется три основных метода лечения злокачественных новообразований: лучевой, хирургический и комбинированный, который заключается в сочетании первых двух. В последние годы более широкое распространение получила химиотерапия, особенно регионарная. Однако современное состояние химиотерапии опухолевых заболеваний позволяет использовать ее как самостоятельный метод лишь при отдельных формах злокачественных опухолей, преимущественно это — острый лимфобластный лейкоз у детей, лимфома Бэркитта, семинома яичка, хорионэпителиома, опухоль Вилмса. При остальных злокачественных новообразованиях лекарственная терапия является лишь одним из составных элементов комплексного лечения, дополняющим основные методы — лучевой и хирургический (Н. Н. Блохин, 1977).

Химиотерапевтические препараты действуют на различные звенья обменных процессов, причем они влияют в одинаковой степени на опухолевую и на здоровую ткани, подавляя защитные силы организма. Это отрицательное свойство резко ограничи-

вает их применение, поскольку реактивность организма, его иммунный надзор играют решающую роль в механизме канцерогенеза и метастазирования (Р. Е. Кавецкий, 1977). Поэтому поиски новых препаратов, особенно естественного происхождения, ведутся широко и постоянно. В последние годы привлекают особое внимание препараты ферментов, которые имеют существенное преимущество перед химиотерапевтическими препаратами синтетического происхождения, так как им присущи строгая специфичность в отношении определенных субстратов и высокая каталитическая активность.

Применение ферментов при лечении опухолей не преследует цели возвращения опухолевой клетки к нормальному ее состоянию, аналогично тому, как и терапия другими биологически активными веществами (например, гормонами) не приводит к нормализации функции органов внутренней секреции. Однако продолжительным введением ферментов непосредственно в опухоль можно добиться контроля над скоростью роста, дифференцировки, инвазивности и метастазирования раковой опухоли.

Ферменты в комплексной терапии ран и лучевых осложнений при злокачественных новообразованиях ЛОРорганов

Лечение послеоперационных ран и лучевых осложнений у больных злокачественными новообразованиями ЛОРорганов, несмотря на значительные достижения в этой области, остается еще сложной и нерешенной проблемой. Это объясняется локализацией опухолей в зоне облученных тканей, где изменения носят не только воспалительный, но и трофический характер.

Проникающая радиация, оказывая разрушающее действие на опухоль, повреждает и здоровую окружающую ткань, которая играет важную роль в репаративных процессах. Вследствие отрицательного влияния проникающей радиации возникают лучевые и послелучевые реакции и осложнения: сухие и влажные эпидермиты, эритемы слизистых оболочек, рентгено- и радиоэпителииты, отеки слизистых оболочек и мягких тканей, хондриты и перихондриты хрящей гортани, хондронекрозы, которые значительно отягощают общее состояние больных, часто вынуждают прерывать лечение, снижая эффективность лучевой терапии. Наиболее тяжелым последствием облучения является развитие отека слизистой оболочки и появление перихондрита хрящей гортани. Консервативные мероприятия в настоящее время мало эффективны в предотвращении и лечении указанных осложнений. Поэтому они заканчиваются развитием стеноза гортани, что нередко заставляет прибегать к срочной трахеотомии,

а иногда и к полному удалению гортани. Введение в лечебную практику антибиотиков и сульфаниламидов значительно улучшило исходы оперативных вмешательств на гортани, особенно у лиц, не подвергавшихся лучевой терапии. У больных, получивших полный курс облучения (иногда повторный), применение антибиотиков мало эффективно, в связи с чем в послеоперационном периоде у них часто наблюдается расхождение швов, развитие обширных и глубоких гнойно-некротических процессов в ране, появление индуративных отеков в области мягких тканей шеи. Вследствие пониженной способности окружающих рану тканей к репаративным процессам замедляется отторжение некротических масс и рост грануляций. Заживление такой раны происходит слишком медленно и заканчивается образованием глоточного свища или стойкой фарингоэзофагостомы. В подобных случаях нередко прибегают к пластическим операциям по закрытию образовавшихся дефектов глоточно-пищеводного соустья, которые также не всегда эффективны, поскольку используются при этом ткани шеи, подвергавшиеся облучению. Формирование филатовского стебля в области груди и миграция его к фарингоэзофагостоме значительно удлиняют сроки выздоровления больных. Стремление хирургов ускорить заживление обширных гнойно-некротических ран заставляет их прибегать к поискам новых, более эффективных лекарственных средств.

Лечение гнойно-некротических процессов преследует цели раннего удаления девитализированных тканей из раны, подавления микрофлоры и ускорения регенерации. Широкое увлечение антибиотиками при лечении гнойных ран долгое время оставляло в стороне процессы некролиза, а применение гипертонических растворов поваренной соли в фазе гидратации способствовало лишь удалению из ран продуктов распада, образующихся под действием протеолитических ферментов, которые освобождались из поврежденных тканей.

Доказано, что ферментным системам принадлежит основная роль в очищении ран от гноя и нежизнеспособных тканей. Еще в 1952 г. И. В. Давыдовский сообщал, что управление процессами регенерации возможно лишь ферментативным путем. Это побудило многих хирургов использовать ферменты протеолитического и нуклеазного действия для лечения гнойно-воспалительных процессов (В. И. Стручков и соавт., 1970; В. К. Гостищев и соавт., 1973, и др.).

Мы применили ферменты в комплексной терапии послеоперационных ран и лучевых осложнений у 164 больных злокачественными новообразованиями ЛОРорганов, в основном раком

гортани, находившихся на стационарном лечении в Киевском НИИ отоларингологии за период с 1965 по 1975 г.

Послеоперационные раны у больных ЛОРонкологическими заболеваниями имеют свои особенности: фазы альтерации и и пролиферации протекают у них более торпидно и длительно по сравнению с больными неонкологическими болезнями. Помимо возраста и основного заболевания на течение репаративных процессов у этих больных значительное влияние оказывает также то, что оперативное лечение сочетается с предварительной рентгено- или телегамматерапией, что еще больше снижает общую и местную сопротивляемость организма к инфекции, угнетает интенсивность обменных процессов.

Для лечения применялись трипсин, химотрипсин, химопсин (смесь трипсина и химотрипсина), РНК-аза и ДНК-аза. Вышеуказанные препараты ферментов использовали в отдельности и в различных сочетаниях между собой, антибиотиками и мочевиной. Пути введения ферментов: местное применение в виде аппликаций, присыпок, орошений, обильно увлажненных тампонов; внутримышечные инъекции; ингаляции аэрозолей.

Показания к использованию ферментов нами условно были разделены на три группы: а) профилактика осложнений, т. е. введение энзимов сразу после операции, а иногда и раньше — за 2—3 дня до операции; б) лечение осложнений, когда энзимы применяли после расхождения швов в ране и образования некроза мягких тканей; в) терапия лучевых реакций и осложнений с помощью ингаляций ферментов в виде аэрозолей и внутримышечных инъекций.

Ферменты в профилактике послеоперационных осложнений. Для предупреждения послеоперационных осложнений ферменты одновременно с антибиотиками вводили внутримышечно в тех случаях, когда имелись основания предвидеть подобные осложнения: при расширенной ларингэктомии, когда вместе с удалением гортани производилось иссечение части шейного сегмента пищевода, боковой стенки глотки, корня языка, доли щитовидной железы; операции гайморотомии по Денкеру или Муру с удалением опухоли; после массивной дозы лучевой терапии или неоднократного курса облучения; при наложении плановой фарингоэзофагостомы во время расширенной экстирпации гортани; после частичных резекций гортани.

Так как протеолитические ферменты обладают противовоспалительными свойствами и способностью уменьшать отек при парентеральном введении, мы (К. Н. Веремеенко и соавт., 1968) с целью профилактики осложнений больным раком гортани внутримышечно вводили трипсин и химотрипсин. Наряду с фермен-

тами больные получали антибиотики (пенициллин, стрептомицин, морфоциклин). Методика применения протеолитических ферментов была следующей: 10 мг кристаллического трипсина или химотрипсина, содержащегося во флаконе, растворяли в 2—4 мл 0,5% раствора новокаина и вводили внутримышечно по 5—10 мг 2 раза в сутки на протяжении 10 дней и больше. Антибиотики, а также нередко и ферменты, начинали вводить за 2—3 дня до хирургического вмешательства и продолжали в послеоперационном периоде до устойчивой нормализации температуры. Лицам, подвергшимся полной экстирпации гортани или частичной ее резекции с наложением трахеостомы, наряду с парентеральным введением ферментов целесообразно в первые дни закапывать в трахею 0,25% раствор трипсина или химотрипсина по 8—10 капель каждые 30 мин с периодическим отсасыванием через трахеостому содержимого трахеи и бронхов с помощью электроотсоса. Протеолитические ферменты, разжижая густую вязкую мокроту, значительно улучшают дренажную функцию бронхов и предотвращают развитие послеоперационной пневмонии.

Послеоперационный период у больных, получавших внутримышечные инъекции протеиназ в сочетании с введением их в трахею, протекал без осложнений, реактивные явления в тканях, окружающих рану, были выражены незначительно. Откаркивание слизи и мокроты через трахеотомическую канюлю облегчалось вследствие их разжижения. Из 52 больных, которые подвергались ферментотерапии в послеоперационном периоде, первичное заживление раны наблюдалось у 37 лиц, у 13 — рана зажила вторичным натяжением и лишь у 2 больных понадобилась пластическая операция. В то же время из 52 больных, не получавших в послеоперационном периоде трипсина и химотрипсина, первичное заживление ран наблюдалось у 19 больных, вторичным натяжением рана закрылась у 26 и у 7 больных необходимо было пластическое закрытие глоточно-пищеводного дефекта.

Ферменты в комплексной терапии послеоперационных ран. Протеиназы нашли применение при лечении гнойно-некротических процессов, возникающих при заживлении ран после ларингэктомии и резекций гортани.

С целью ускорения раневого отделяемого, отторжения некротизированных тканей и более раннего гранулирования мы разработали следующую схему лечения послеоперационных ран: для местного применения ферменты (трипсин, химотрипсин, химопсин, рибонуклеаза) назначали как в отдельности, так и в комбинации с антибиотиками — стрептомицином и морфоцикли-

ном. Антибиотики применяли с учетом чувствительности к ним микрофлоры в дозе (250 000—1 000 000 ЕД), варьирующей в зависимости от величины раневой поверхности и глубины некроза. Мы также всегда учитывали фазу течения раневого процесса (гидратации и дегидратации). Так, при наличии некроза с обильным гнойным отделяемым рану присыпали порошком фермента и антибиотика, подобранного соответственно чувствительности к нему микрофлоры. Дозы фермента определяли в зависимости от площади и глубины раневой поверхности, наличия карманов и затеков, обилия и характера раневого отделяемого. Если раневого отделяемого было немного, то растворяли 25—100 мг одного из энзимов (и соответственно 250 000—1 000 000 ЕД антибиотика) в 10—30 мл физиологического раствора, обильно смачивали марлевый тампон или салфетки и вводили в рану на сутки. Для ускорения эвакуации раневого содержимого, лизированного ферментом, в рану вводили дополнительно марлевый тампон с гипертоническим (10%) раствором хлористого натрия, который, как было установлено в опытах in vitro, не влияет на протеолитическую активность применяемых нами ферментов. В большинстве случаев через 8—10 дней от начала лечения ферментами рана очищалась от некротических масс и появлялся рост сочных грануляций. В этот период мы прекращали введение в рану тампонов с гипертоническим раствором хлористого натрия, так как последний высушивает и повреждает молодую грануляционную ткань. В отдельных случаях процесс очищения и заживления ран был более длительным, что объяснялось глубоким дистрофическим изменением мягких тканей в результате повреждающего действия лучевой терапии. Нередко течение раневого процесса сопровождалось появлением неприятного запаха, еще более усиливающегося при местном введении ферментов. В подобных случаях с целью дезодорации мы пользовались инсуфляцией йодоформа, чередуя ее с введением в рану энзимов. Применение одного йодоформа, как было установлено нами раньше, не ускоряло процесса отторжения некротических масс, заживление раны происходило медленно и выздоровление больных наступало позже.

У больных с послеоперационными осложнениями после ларингэктомии в виде обширных и глубоких некротических процессов в ране с вовлечением в патологический очаг не только поверхностных тканей (кожи и подкожной клетчатки), но и глубоко расположенных образований (фасций, глубоких мышц шеи, сосудисто-нервного пучка) местное применение рибонуклеазы и антибиотика сочетали с внутримышечными инъекциями трипсина или химотрипсина, причем РНК-азу и антибиотик использо-

вали в виде присыпок в раиу (25—100 мг эизима и 250 000—1 000 000 ЕД соответствующего антибиотика), а протеиназы вводили парентерально по 5 мг 2 раза в сутки на протяжеиии 10 дией и больше (К. Н. Веремеенко и соавт., 1968).

Во время перевязки для удалеиия иекротических тканей, лизированиых ферментом, раиу промывали 3% раствором перекиси водорода, осушали марлевыми шариками и присыпали порошком энзима и антибиотика. Расщепляя девитализированиые белки, ферменты, по мнению Abderhalden (1961), лишают микроорганизмы питательной среды и делают их более доступными действию антибиотиков.

Комплексное введение РНК-азы и трипсина (химотрипсина) способствовало очищению раи от иекротических масс, уменьшению отека окружающих тканей и ускорению перехода раневого процесса в фазу дегидратации — активный репаративиый период. В некоторых случаях при наличии «толстых» некротических масс в ране мы вначале удаляли их хирургическим путем, после чего поверхность раны засыпали порошком фермента и антибиотика. Однако в связи со значительной распространенностью некроза в глубь раны и опасностью повреждения сосудисто-нервного пучка шеи это не всегда удавалось произвести.

При лечении больных ЛОРонкологическими заболеваниями с обширными и глубокими некрозами в ране необходимо учитывать и другие факторы, которые играют важную роль в репаративных процессах: общее состояние организма, его иммунобиологическую реактивность, витаминную обеспеченность и др. Поэтому при комплексном лечении этих больных, наряду с ферментами и антибиотиками, назначались поливитамины и средства, улучшающие иммунологическую реактивность организма (переливание крови, плазмы и различных кровезаменителей).

Для сравнения полученных данных была обследована контрольная группа из 30 больных с аналогичными заболеваниями, которых лечили обычными методами — введением в рану тампонов с 10% раствором хлористого натрия, инсуфляцией йодоформа, мазевыми повязками. Включение ферментных препаратов в комплекс лечебных мероприятий сокращало сроки очищения ран от некротических масс (с 16,5 до 8 сут), ускоряло рост грануляционной ткани с 19,5 до 10,5 сут и приближало время проведения пластических операций с 34 до 21 сут.

Энзимотерапию проводили на фоне общепринятых методов лечения послеоперационных осложнений: своевременного раскрытия раны, удаления гноя, дренирования полости, антибактериальной и общеукрепляющей терапии. При оценке течения раневого процесса мы учитывали характер экссудата, наличие ги-

перемии и отечности окружающих рану тканей, сроки очищения ран от некротических масс, появление и вид грануляций, цвет, консистенцию, кровоточивость их, время подготовки фарингоэзофагостомы к пластической операции. Для суждения о характере регенеративных процессов изучали цитологию ран по методу М. П. Покровской и М. С. Макарова (1942). Исследовали pH раневого содержимого, принимая во внимание, что активность ферментов зависит в значительной мере от среды, в которой проявляется их действие. Микробиологический контроль осуществляли с помощью определения микрофлоры и чувствительности ее к антибиотикам.

Изменения состояния ран в процессе энзимотерапии наступали через 1—2 сут и определялись макроскопически и при микроскопии мазков-отпечатков. Макроскопические изменения заключались в выраженном некролитическом и противовоспалительном действии ферментов, более ускоренном очищении раневой поверхности от нежизнеспособных тканей и росте грануляций.

После 1—2 перевязок раневая поверхность покрывалась жидкими некротическими массами, нередко с запахом, которые удалялись при промывании из шприца раствором перекиси водорода и просушивании марлевыми тампонами. При этом отмечалось улучшение состояния больного: исчезали боли, уменьшались отечность и воспалительная инфильтрация окружающих рану тканей. К 7—8-му дню энзимотерапии в большинстве случаев раневая поверхность полностью очищалась от нежизнеспособных тканей, появлялись здоровые, розовые, легко кровоточащие грануляции, полностью исчезала воспалительная инфильтрация. В некоторых случаях очищение раны затягивалось на более продолжительный срок (до 3—4 нед и более): в этих случаях сказывалось влияние массивных доз лучевой терапии. Иногда уже во время операции у части больных становилось возможным до некоторой степени предвидеть по внешнему виду тканей (последние напоминали вареное мясо) неблагоприятный ход заживления раневого процесса. Таким образом, скорость очищения ран зависела от количества некротизированных тканей и глубины некротических изменений, вызванных проникающей радиацией.

Более заметное некролитическое действие у таких больных наблюдалось при сочетании местного применения нуклеаз в виде присыпок с внутримышечными инъекциями протеолитических ферментов.

У больных контрольной группы процесс заживления ран протекал значительно медленнее — в среднем 35—40 дней (в отдельных случаях даже 2—3 мес).

При микроскопическом изучении мазков-отпечатков ран непосредственно перед началом применения ферментов обнаруживалось большое количество дегенеративных форм нейтрофильных лейкоцитов.

После 2—3-кратного применения ферментов число нейтрофильных лейкоцитов снижалось, резко уменьшалось количество дегенеративных форм; увеличивалось содержание полибластов и макрофагов. Как только наступало очищение раны от нежизнеспособных тканей (4—5-й день энзимотерапии), количество макрофагов быстро уменьшалось при одновременном увеличении числа полибластов. Такое изменение клеточного состава раневого отделяемого в процессе местного и парентерального введения энзимов не выходило за пределы известных патофизиологических процесов, происходящих в гнойной ране при естественном их течении, но значительно сокращало сроки отдельных фаз течения раневого процесса (в частности, стадию гидратации), что свидетельствовало об активном репаративном процессе.

Наряду с изменением клеточного состава ран в процессе энзимотерапии наблюдалась тенденция к нормализации протеинограмм крови и содержания α_2-МГ (К. Н. Веремеенко, Г. А. Опанащенко, 1968).

До начала лечения ферментами микрофлора была устойчивой к пенициллину в 72% случаев, стрептомицину — в 68,5%, левомицетину — в 41%, тетрациклину — в 43%, морфоциклину — в 35%. К концу лечения, перед выполнением пластической операции, у 45% больных рост микрофлоры не обнаружен. После лечения ферментами изменилась и чувствительность микрофлоры к антибиотикам: к пенициллину ее устойчивость снизилась до 26,5%, к стрептомицину — до 35,6%, левомицетину — до 30%, тетрациклину — до 11,2%, морфоциклину — до 10,2%. Следовательно, в процессе энзимотерапии возрастает чувствительность микрофлоры к антибиотикам и повышается их эффективность в лечении послеоперационных ран.

Механизм изменения антибактериального действия антибиотиков под влиянием ферментов, как отмечают В. И. Стручков и соавторы (1970), во многом неясен. По мнению Reiser (1953), протеолитические ферменты, лизируя белки, лишают микробную клетку питательных веществ, необходимых для ее роста и размножения. Кроме того, при наличии обильного гнойного отделяемого и некротических тканей эффект антибиотиков ослаблен ввиду затрудненного их доступа к микроорганизмам, а энзимы, расщепляя составные части гноя и омертвевших тканей, облегчают контакт антибактериальных препаратов с микробной клеткой.

В последние годы при лечении ожоговых ран с целью усиления расщепляющей способности протеиназ стали применять мочевину (А. А. Тюкина, 1973). Мы использовали ее в сочетании с протеолитическими ферментами для лечения послеоперационных ран у больных ЛОРонкологическими заболеваниями.

Методика лечения заключалась в следующем: если рана находилась в стадии гидратации с обильным гнойным отделяемым, ее промывали перекисью водорода (3% раствор), осушали раневую поверхность марлевыми шариками, удаляя остатки некротических масс, и засыпали в рану приготовленную ex tempore смесь сухой мочевины с трипсином (химотрипсином) в соотношении 10 весовых частей мочевины и 1 часть фермента. При переходе раны в фазу дегидратации, когда раневого отделяемого было немного, смесь фермента и мочевины (10 мг и 100 мг соответственно) растворяли в 20 мл физиологического раствора, смачивали этим раствором тампоны или салфетки и оставляли их в ране на сутки.

Под наблюдением находилось 20 больных раком гортани с тяжелыми осложнениями в послеоперационном периоде — обширными и глубокими некротическими процессами в ране после расширенной ларингэктомии или ларингэктомии с одновременной операцией Крайля. Все они лечились ферментами в сочетании с мочевиной по вышеуказанной методике. Результаты этих исследований показали, что сроки очищения послеоперационных ран у таких больных сокращаются почти в 2 раза по сравнению с обычными методами лечения (соответственно 7 и 13 дней), а грануляционная ткань образуется еще быстрее (9 дней по сравнению с 21 в контрольной группе). Следует учесть, что все обследуемые подвергались в дооперационном периоде облучению в дозе от 12 000 до 15 000 рад (повторными курсами), вследствие чего послеоперационный период, несмотря на парентеральную антибиотикотерапию, протекал очень тяжело — с высокой температурой в течение 7—10 дней.

Ферменты в терапии лучевых осложнений. В настоящее время удалось добиться значительного уменьшения лучевого воздействия на поверхностно расположенные ткани кожи, подкожной клетчатки, мышцы, хрящи гортани благодаря более широкому внедрению в медицинскую практику гамматерапевтических установок, но лучевая нагрузка на слизистую оболочку гортани, где поглощенная доза практически остается равной или близкой таковой в опухоли, не уменьшилась.

Мы проводили лечение ферментами лучевых осложнений, которые обычно характеризуются появлением неприятных ощущений в глотке, саднения, нередко болями. При фаринго-ларинго-

скопии при этом определяется выраженная гиперемия и даже отечность слизистой оболочки глотки и гортани. Увеличение дозы облучения обычно сопровождается усилением неприятных ощущений в глотке, появлением постоянной боли при глотании, прогрессированием воспалительного процесса. Наряду с выраженной гиперемией и отечностью слизистой оболочки отмечаются островки беловато-серых налетов, расположенных по слизистой оболочке в месте и вокруг зоны облучения. Это так называемыей островковый, или очаговый, эпителиит. Он появляется при облучении в дозе 3500—4000 рад. Если лучевую терапию не прекратить, то островки налетов сливаются и приобретают вид пленок, т. е. возникает пленчатый, или диффузный, эпителиит. Чаще всего он появляется при облучении в дозе 4500—5500 рад. Общее состояние больных при этом ухудшается, из-за резких болей в глотке они отказываются от приема пищи, нередко у них повышается температура тела.

Для лечения ранних лучевых осложнений у 37 больных раком гортани и гортаноглотки мы использовали ДНК-азу местно в виде ингаляций аэрозолей и внутримышечные инъекции трипсина и химотрипсина. Применяя ДНК-азу, исходили из ее свойств деполимеризовать ДНК — составную часть вязких экссудатов. Перед ингаляцией во флакон, содержащий 15 ЕА ДНК-азы (10 мг), вводили 5 мл физиологического раствора для получения концентрации фермента 3 ЕА в 1 мл раствора. Ингаляции проводили 2—3 раза в сутки в течение 5—10 мин на протяжении 6—8 дней (на одну ингаляцию обычно расходуется 3 мл раствора фермента). После 3—4 процедур больные отмечали облегчение в откашливании мокроты, исчезновение сухости и першения в горле, значительное уменьшение, а иногда и прекращение болей при глотании. При осмотре наблюдалось уменьшение гиперемии слизистой оболочки глотки и гортани, а также исчезновение островков беловато-серых налетов. Такое благоприятное действие ферментов способствовало тому, что больные принимали полный курс лучевой терапии, не делая вынужденного перерыва в лечении.

При появлении пленчатого эпителиита на слизистой оболочке глотки и гортани дальнейшее облучение прекращали, и наряду с ингаляциями ДНК-азы внутримышечно вводили трипсин или химотрипсин по 5 мг 2 раза в сутки до исчезновения воспалительных явлений. С помощью указанных мероприятий в течение 5—6 дней можно ликвидировать выраженную лучевую реакцию и возобновить лечение. Лучший терапевтический эффект наблюдался у тех больных, которые одновременно с ингаляцией ДНК-азы получали парентерально протеолитические

ферменты. Опыт показал, что протеиназы необходимо назначать при появлении первых признаков лучевой реакции, а в некоторых случаях (при установлении вторичных воспалительных явлений в области первичного патологического очага) — за 3—4 дня до начала лучевой терапии.

Во время применения ферментов протеолитического и нуклеазного действия в комплексном лечении послеоперационных ран и лучевых осложнений мы в основном не наблюдали серьезных побочных эффектов. Исключение составляли 7 больных: из них у 3 появились кожные высыпания после внутримышечного введения химотрипсина, а 4 человека предъявили жалобы на жжение в ране после присыпки трипсином, которое было непродолжительным и вскоре прекратилось.

Исследование возможности применения ферментов нуклеинового обмена в комплексном лечении злокачественных опухолей верхних дыхательных путей

В настоящее время предприняты попытки использовать различные группы ферментов, главным образом действующих на нуклеиновые кислоты, белки, аминокислоты, для подавления опухолевого процесса, поскольку с этими веществами связан рост опухоли. Однако положительные результаты получены только в эксперименте (Т. Т. Березов, 1971). Единственным ферментным препаратом, который оказал клинический эффект, в особенности в комплексе с цитостатиками, является L-аспарагиназа, расщепляющая аспарагин, необходимый для синтеза белка. Этот фермент эффективен в лечении лейкозов у детей: наиболее чувствителен к препарату острый лимфобластный лейкоз, худшие результаты получены при миелобластном лейкозе. Это объясняется тем, что лимфобласты не содержат фермента аспарагин-синтетазы, который осуществляет синтез аспарагина, т. е. раковая клетка характеризуется паразитическим типом аминокислотного обмена и использует некоторые аминокислоты хозяина, а сама потеряла способность к их синтезу вследствие дефицита фермента. Поэтому всестороннее изучение ферментов опухолей важно для разработки рациональных путей энзимотерапии в онкологии (С. Р. Мардашев, 1975).

Среди многочисленных биохимических изменений, происходящих в организме, пораженном злокачественным процессом, большое значение имеет нарушение обмена нуклеиновых кислот, находящееся в тесном взаимодействии с другими изменениями в обмене веществ, которые присущи этому заболеванию. Нуклеи-

новые кислоты являются основными соединениями, обеспечивающими рост, развитие, дифференцировку, передачу генетической информации и закрепление наследственных признаков. Значение нуклеиновых кислот в передаче генетической информации, которая связана с опухолевым ростом, объясняет интерес к специфическим ферментам нуклеинового обмена — нуклеазам.

Начиная с 40-х годов XX в. в литературе появляются отдельные сообщения об эффективности воздействия на опухоль некоторых ферментов в эксперименте и клинике. В опытах на животных и в клинике было проверено действие химотрипсина. Krebs и соавторы (1947) сообщают о полном излечении костной саркомы у женщины после внутривенной инъекции 10 мг кристаллического химотрипсина. Данная опухоль была устойчивой к лучевой терапии. Согласно Beard (1949), некоторые саркомы Иенсена полностью исчезали после введения фермента. Больше саркомы рассасывались на 60—80%, но крысы обычно погибали от интоксикации или вторичной инфекции. На доброкачественные опухоли введение химотрипсина не оказывало никакого действия.

В последние годы в литературе по онкологии появился ряд сообщений, указывающих на положительное действие нуклеаз в эксперименте (С. Е. Манойлов и соавт., 1966; Т. Т. Березов, 1971; Б. М. Куриненко и соавт., 1977) и клинике (Л. Г. Богомолова и соавт., 1967; А. А. Габелов и соавт., 1967; А. И. Гнатышак и соавт., 1968; С. Е. Манойлов, 1971; Г. А. Опанащенко и соавт., 1975; Goldberg, Pitts, 1966, и др.). А. А. Габелов и соавторы (1967) применяли РНК-азу в комплексной терапии 34 больных с различными опухолями половой сферы. У 25 из них отмечалось значительное улучшение общего состояния и уменьшение местного опухолевого процесса. Авторы находят целесообразным использование фермента РНК-азы в комплексной терапии онкологических больных. С. Е. Манойлов и соавторы (1966) исследовали действие РНК-азы на рост опухоли в сочетании с проникающей радиацией, которая приводит к резкому изменению проницаемости опухолевых клеток. Лучевая терапия способствует проникновению РНК-азы внутрь опухолевых клеток и их разрушению, вследствие чего повышается терапевтический эффект комбинированного лечения.

О более широком использовании ферментов в эксперименте и клинике сообщается в двух монографиях (С. Е. Манойлов, 1971; Вольф, Рансбергер, 1976).

С целью выяснения возможности использования нуклеаз, в частности РНК-азы, в комплексном лечении больных раком верхних дыхательных путей нами проведен ряд исследований.

В опытах in vitro установлено, что содержание РНК в опухолевой ткани выше, чем в «непораженной» слизистой оболочке гортани, а активность РНК-азы — ниже. Введение РНК-азы в опухолевую ткань вызывает деполимеризацию РНК, причем наибольшая эффективность фермента отмечена при концентрации его 12,5 мг/мл (К. Н. Веремеенко и соавт., 1970). На осторожность выбора концентрации РНК-азы указывает также И. И. Олейник (1966). Предпосылкой этому служит следующее положение. При воздействии на живую клетку эндогенные нуклеазы достигают своих субстратов путем проникновения через клеточную и ядерную мембраны. Вслед за этим могут наблюдаться два процесса: деполимеризация соответствующих нуклеиновых кислот и стимуляция их синтеза. В зависимости от вида клетки, ее физиологического состояния, условий воздействия энзимов в ряде случаев может наблюдаться последовательность обоих указанных процессов или преобладание одного из них. Высокие концентрации ферментов вызывают деполимеризацию нуклеиновых кислот в клетке; слабые концентрации, вероятно, более близкие к физиологическим, могут способствовать синтезу нуклеиновых кислот (Ю. А. Ровенский, 1965). В связи с этим проведена серия исследований по установлению концентрации фермента, которая бы деполимеризовала РНК опухоли, но не влияла на окружающие ее нормальные ткани и не способствовала синтезу РНК опухоли.

Мы (К. Н. Веремеенко и соавт., 1970) вводили РНК-азу в дозе 12,5 мг в 0,5 мл физиологического раствора в толщу опухоли за 2 ч — 1, 3, 7 сут до операции, и количество РНК изучали гистохимически после удаления опухоли. Через 2 ч после инъекции РНК-азы в опухоль содержание цитоплазматической и ядрышковой РНК в зоне введения фермента (рис. 9 и 10) значительно уменьшалось, спустя 1—3 сут размеры зоны деполимеризации гистохимически выявляемой РНК в участках инъекции фермента постепенно увеличивались и достигали наибольшего распространения на 7-е сутки (рис. 11).

Действие экзогенной РНК-азы на РНК опухоли послужило основанием к использованию ее в комплексной терапии 32 больных раком верхних дыхательных путей (Г. А. Опанащенко и соавт., 1975). По локализации опухолевого процесса они распределялись следующим образом: рак гортани — 30 больных, рак носа и придаточных пазух — 8, рак язычка и мягкого нёба — 4. Из этих больных 10 лицам вводили РНК-азу непосредственно в ткань опухоли в дозе 12,5 мг в 0,5 мл 0,5% раствора новокаина на протяжении 10 сут в сочетании с телегамматерапией. Десять больных получали только лучевую терапию на гамматерапев-

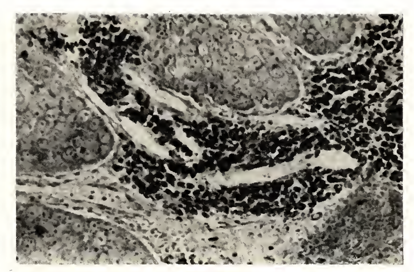


Рис. 9. Плоскоклеточный неороговевающий рак гортани. Опухоль, не подвергавшаяся консервативному лечению. Высокое содержание РНК в клетках плазмоцитарного ряда стромы, в цитоплазме и ядрышках опухолевой паренхимы. Ок. 10, об. 9.

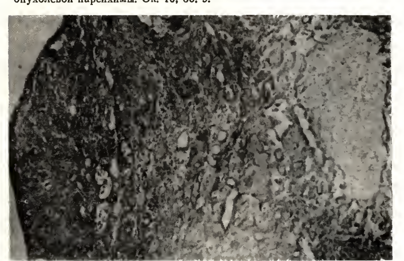


Рис. 10. Шиповидноклеточный неороговевающий рак гортани. Два часа после введения раствора кристаллической РНК-азы в дозе 12,5 мг в толщу опухоли. Исчезновение цитоплазматической и ядрышковой РНК из паренхимы и стромы опухолевой ткани в зоне инъекции фермента. Ок. 10, об. 9.

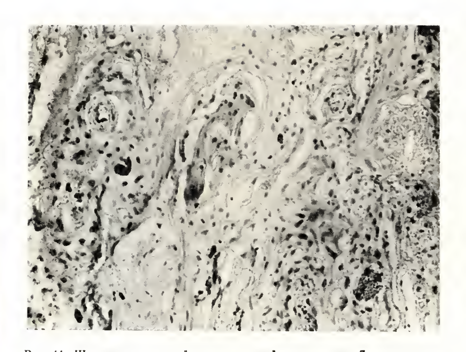


Рис. 11. Шиповидноклеточный ороговевающий рак гортани. 7-е сутки после введения раствора кристаллической РНК-азы в дозе 12,5 мг в толщу опухоли. Деполимеризация цитоплазматической и ядрышковой РНК в клетках паренхимы и стромы на протяжении всего препарата. Ок. 10, об. 9.

тической установке ГУТ-Со-400 в суммарной дозе 6000—11 000 рад. Значительное уменьшение или исчезновение опухоли и улучшение общего состояния организма было более выражено у тех лиц, которым РНК-азу вводили непосредственно в опухолевую ткань в сочетании с телегамматерапией.

Действие энзимов непосредственно на опухолевую ткань исследовали у 22 больных, которым в период подготовки к оперативному вмешательству проводилась ферментотерапия. Если опухоль была ограниченной, вводили только РНК-азу непосредственно в очаг в дозе 12,5 мг в 0,5 мл 0,5% раствора новокаина на протяжении 10 дней (первая группа из 11 больных). При более распространенном опухолевом процессе введение РНК-азы в очаг сочеталось с внутримышечными инъекциями трипсина или химотрипсина в дозе 10 мг в сутки на протяжении 10 дней (вторая группа из 11 больных). Предварительное введение РНК-азы в опухолевую ткань перед операцией не только улучшало общее состояние больных (снятие болевых ощущений, улучше-

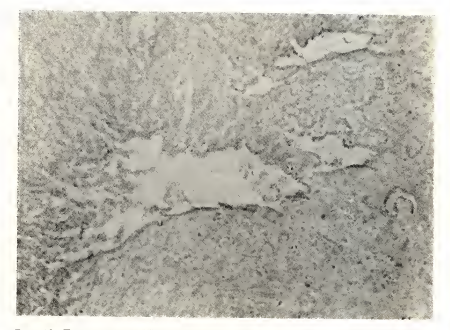


Рис. 12. Плоскоклеточный неороговевающий рак гортани. Введенне РНК-азы по 12,5 мг в толщу опухолн в теченне 10 дней. Нızкое содержанне РНК в клетках паренхнмы н стромы опухоли. Ок. 10, об. 9.

ние дыхания при наличии его затруднения), но и оказывало влияние на уменьшение опухоли, которое связано, по-видимому, со снятием перифокального воспаления, возникающего в результате присоединения вторичной инфекции, и с регрессией самой опухоли. Побочных реакций при введении РНК-азы в опухолевую ткань не отмечено.

При гистохимическом исследовании РНК в первой группе больных в зоне введения РНК-азы отмечалось выраженное уменьшение содержания РНК в ядрышке и цитоплазме базального слоя раковых ячеек, а в цитоплазме и ядрышках шиповидных клеток ее содержание было очень низким, что свидетельствовало о деполимеризации последней. В соединительнотканной строме опухоли обнаруживались в умеренном количество клетки гистиоплазмоцитарного ряда с очень низким содержанием РНК (рис. 12).

При постановке реакции Фельгена на ДНК в раковых опухолях больных первой группы обнаруживалось низкое содержание фельгенположительного вещества в ядрах клеток паренхи-

мы опухоли, в ядрах фибробластов и клеток плазмоцитарного ряда. Кроме того, в зоне введения РНК-азы обнаруживалось большое количество клеток с признаками вакуолизации ядер, перинуклеарным расположением хроматина. Нередко выявлялся ядерный детрит. У больных второй группы содержание РНК в ядрышках и цитоплазме клеток паренхимы и стромы опухоли в зоне введения РНК-азы было снижено в большей степени. Гистохимическая характеристика ДНК не отличалась от таковой у больных первой группы.

Небольшое количество наблюдений не позволяет еще сделать вывод об эффективности местного применения РНК-азы при злокачественных новообразованиях ЛОРорганов. Для этого необходимо дальнейшее накопление фактического материала и главным образом оценка отдаленных результатов энзимотерапии. Разработка методов сочетанного применения нуклеаз с лучевой терапией также заслуживает внимания и требует дальнейшего изучения.

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ В ТЕРАПИИ ЛОРЗАБОЛЕВАНИЙ

В ЛОРклинике с лечебной целью начали применять не только ферменты, но и вещества, вызывающие торможение их активности,— ингибиторы. Среди них наибольший интерес представляют ингибиторы протеиназ, которые участвуют в регуляции активности протеолитических систем в организме. В условиях нормы в тканях и крови большая часть протеиназ находится в виде неактивных предшественников или в комплексе с ингибиторами. При патологии в результате нарушения целостности клеточных мембран может происходить активация проферментов или освобождение ферментов из связанного состояния, при этом система естественных ингибиторов не может обеспечить адекватный контроль активных форм протеиназ. Такая избыточная активация протеолиза наблюдается при ряде патологических процессов в особенности в органах и тканях, содержащих большие количества потенциально активных зимогенов или активаторов (поджелудочная железа, кровь, легкие, матка, предстательная железа). Для нейтрализации повышенной энзиматической активности целесообразно вводить в организм ингибиторы протеолитических ферментов.

В настоящее время наметились две основные области применения ингибиторов протеолиза в оториноларингологии: 1) при нарушении гемостаза и 2) при аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей.

Применение ингибиторов протеолиза при нарушении процессов гемостаза

Проблема предупреждения и терапии нарушений процессов гемостаза при ЛОРзаболеваниях до настоящего времени остается актуальной. В генезе нарушений процессов гемостаза важную роль играет противосвертывающая система крови, в частности фибринолиз (Г. А. Андреенко, 1967; А. И. Грицюк, 1968). Процесс фибринолиза активируется при ряде физиологических и патологических состояний, что сопровождается кровотечениями, нередко представляющими опасность для жизни больного.

Механизмы развития фибринолитических кровотечений могут быть различными. В одних случаях активация фибринолиза происходит в результате попадания в кровь его активаторов (первичный фибринолиз), в других — является защитной реакцией организма на поступление в кровь тромбопластических веществ, катализирующих образование тромбина (вторичный фибринолиз). Часто одновременно активируется фибринолитическая и свертывающая системы крови вследствие поступления в кровь активаторов фибринолиза и тромбопластина. Для дифференциации этих кровотечений важным подспорьем служит исследование коагулограммы крови (М. С. Мачабели, 1967).

В результате активации основного фермента фибринолиза — плазмина белки крови — фибриноген, фактор V и другие компоненты, участвующие в образовании тромбопластина, подвергаются расщеплению. При гидролизе фибриногена образуются продукты его распада, которые тормозят адгезивность и агрегацию тромбоцитов и блокируют превращение фибрин-мономера в фибрин-полимер (К. Н. Веремеенко, 1971).

Для нормализации нарушенных звеньев гуморального гемостаза наряду с препаратами крови (фибриногеном, антигемофильной и викасольной плазмой и др.) успешно используются новые специфические средства — ингибиторы фибринолиза — природные и синтетические (А. Г. Караванов, М. А. Уманский, 1969). Механизм лечебного действия синтетических и природных ингибиторов фибринолиза различен. Первые тормозят превращение плазминогена в плазмин, вторые — инактивируют непосредственно плазмин, тормозят активацию плазминогена, а в высоких дозах обладают антикоагулянтной активностью, обусловленной угнетением начальных фаз образования тромбопластина.

В ЛОРклиниках при ряде заболеваний отмечают нарушения гемостаза и, в особенности, фибринолиза. К их числу относятся

фибринолитические кровотечения, возникающие после тонзиллэктомии и других операций на ЛОРорганах (юношеские фибромы носоглотки, опухоли придаточных пазух носа и др.). По данным Б. С. Преображенского (1970), кровотечения после тонзиллэктомии встречаются у 10—12% больных. Bergoni и Ottaviani (1965) наблюдали 12 больных с профузными послеоперационными кровотечениями из раны как непосредственно после тонзиллэктомии, так и на 7—8-й день после операции. До операции во всех случаях показатели коагулограммы были в пределах нормы. У 6 больных из 12 непосредственно после операции (12—24 ч) резко повышалась фибринолитическая активность крови, что, вероятно, связано с образованием плазмина под действием тканевых активаторов, поступающих в кровь из поврежденных миндалин. Механизм активации фибринолиза может быть и иным: во время травмы миндалин из определенных штаммов β-гемолитического стрептококка освобождается стрептокиназа, которая через систему проактиватор — активатор превращает плазминоген в плазмин. В этом случае активатор попадает в кровоток, и процесс приобретает генерализованный характер: активация фибринолиза происходит в общем сосудистом русле.

Для торможения фибринолиза и предупреждения связанных с ним кровотечений отоларингологи начали использовать антифибринолитические препараты, в основном синтетического происхождения. В ряде работ отмечена целесообразность применения ε-АКК при тонзиллэктомиях (В. И. Тимошенский, В. Х. Гербер, 1967; Е. В. Элиас, 1968; В. А. Елхов, 1971; O'Berbosch, Hart, 1970, и др.).

Dumay и Dance (1964) показали эффективность внутривенного введения ε-АКК (6—8 г за 20 мин до операции): при этом уменьшались операционные кровотечения и боли, ускорялось заживание ран. Для предупреждения кровотечений при тонзиллэктомии Л. Н. Халфен (1967) за час до операции вводил больным ε-АКК внутривенно в течение 6—10 мин в дозе 1,5—3 мл 6% раствора препарата вместе с 20 мл 40% раствора глюкозы. Наблюдалась нормализация показателей коагулограммы: снижалась фибринолитическая активность и повышалась толерантность плазмы к гепарину. Для профилактики кровотечений Е. В. Элиас (1969) с успехом применил 53 больным хроническим тонзиллитом ε-АКК перорально в дозе 2,5—5,0 г за 1,5 ч до операции. В послеоперационном периоде отек ткани в ложе миндалин уменьшался. Этот автор советует также для остановки кровотечений из носа и миндалин вводить тампоны, пропитанные 5% раствором ε-АКК.

С целью предотвращения послеоперационных кровотечений при тонзиллэктомиях С. П. Грома (1969) предложил вводить больным с повышенной антикоагулянтной и фибринолитической активностью крови ε-АКК перорально в дозе 0,07 г/кг массы тела за 2 часа до операции. Введение 0,04 г/кг ε-АКК за 1,5—2 ч до операции и послеоперационная инсуфляция гемостатической губки в миндаликовые ниши оказались эффективными для профилактики кровотечений у больных без признаков нарушения показателей свертывающей системы крови и фибринолиза. При количестве тромбоцитов меньше 220 000 в 1 мм³, удлинении времени свертывания, наличии в анамнезе указаний на склонность к геморрагиям для профилактики кровотечений из ниш миндалин в раннем послеоперационном периоде С. П. Грома (1969) предлагает вводить перед операцией в околоминдаликовые пространства ингибитор протеиназ трасилол совместно с анестетиком (2,5 мл — 2 500 КИЕ трасилола в 15—20 мл 0,5% раствора новокаина). По мнению автора, при таком способе введения угнетается как плазмин, так и активация плазминогена тканевыми и бактериальными лизокиназами, освобождающимися при нарушении целостности ткани миндалин.

По данным М. К. Гаджиева (1976), местное введение ε-АКК в толщу миндалин в сочетании с новокаином при анестезии улучшает течение послеоперационного периода, ускоряет эпителизацию ниш и заживление послеоперационных ран. В. М. Шевцов и В. А. Елхов (1976) установили, что локальное или внутривенное введение ε-АКК до тонзиллэктомии снижает операционную кровопотерю, способствует образованию фибринозного налета, уменьшает отек сосудистых стенок, что было подтверждено гистологически. Mazauric и соавторы (1972) показали антигеморрагическое и противоотечное действие растворов ε-АКК при тонзиллэктомиях. При носовых кровотечениях подслизистое впрыскивание ε-АКК создает условия для склерозирования и облитерации сосудов кровоточащего участка носовой перегородки (М. К. Гаджиев, 1975). Пероральное применение ε-АКК уменьшает степень кровотечений при проведении слухоулучшающих операций у больных отосклерозом (Н. Г. Герасименко, В. В. Щуровский, 1976).

Нами (К. Н. Веремеенко и соавт., 1972) обосновано применение трасилола и его аналогов раздельно и в сочетании с синтетическими антифибринолитиками (ε-АКК и ее производные) и гемостатическими препаратами (фибриноген, желатиноль) при проведении операций на ЛОРорганах. Об эффективности лечения судили на основании клинических данных и результатов исследования коагулограммы крови.

Под наблюдением находилось 27 больных, они были разделены на три группы. В первую группу вошли больные, которым ингибиторы фибринолиза вводили с профилактической целью. Вторую группу составили больные с обильными носовыми кровотечениями, получавшие трасилол и ε-АКК, а также плазмозаменитель — желатиноль. В третьей группе были больные, у которых наблюдалось кровотечение в различные сроки после тонзиллэктомии.

Для профилактики фибринолитических кровотечений у больных (юношеские фибромы носоглотки, опухоли придаточных пазух носа и др.), наряду с общепринятой предоперационной подготовкой (анальгетики, холинолитики, антигистаминные препараты), накануне операции назначили внутрь ε-АКК в дозе 0,07 г/кг массы тела больного. В день операции внутривенно капельно вводили 25 000—50 000 ЕД трасилола и 100 мл 5% раствора ε-АКК. Первые 2 дня после операции больной получал по 0,04 г/кг массы ε-АКК через каждые 6 ч. Для лечения фибринолитических кровотечений внутривенно капельно вводили желатиноль в дозе 500—1000 мл в сочетании с трасилолом (50 000—100 000 ЕД). Как показали биохимические исследования, такая комбинация возможна: в присутствии желатиноля биологическая активность трасилола полностью сохраняется. После остановки кровотечения назначали ε-АКК по 0,04 г/кг массы через каждые 4 ч в течение 3 дней. Двум больным вместо трасилола капельно вводили контрикал в дозе 100 000—200 000 ЕД. При повышении фибринолитической активности крови и снижении уровня фибриногена рекомендуется вводить его (2—4 г) в комплексе с трасилолом (50 000—100 000 ЕД). Последний предохраняет вводимый фибриноген от расщепления плазмином. Он также тормозит активацию плазминогена, который обычно содержится в виде примесей в выпускаемых препаратах фибриногена, прочно с ним связан и может служить субстратом для активаторов фибринолиза, циркулирующих в сосудистом русле. Всем больным вводили ингибиторы фибринолиза, корректировали кислотно-щелочное равновесие и водно-солевой баланс.

Эффективность терапии ингибиторами фибринолиза оценивали по показателям свертывающей и фибринолитической систем крови. Кроме того, у ряда больных изучалось содержание продуктов распада фибриногена, которое позволяет судить об активации фибринолиза. Исследование коагулограммы проводили до и после терапии ингибиторами фибринолиза (обычно на 2—3-й день). Контрольную группу составляли 11 доноров.

В дооперационном периоде у больных выявлено достоверное снижение активности фибринстабилизирующего фактора, концентрации α_2-МГ и повышение уровня фибриногена, который составлял в среднем 304 мг% (в норме 227 мг%), а у 5 из 9 больных — от 335 до 585 мг% (табл. 32). Наряду с нарастанием концентрации фибриногена у этих лиц снижалась фибринолитическая активность крови: время лизиса эуглобулинового осадка варьировало от 660 до 385 мин (в норме эта величина равна 346 мин). У 6 человек отмечено также снижение толерантности плазмы к гепарину, что позволяет говорить о более медленной свертываемости крови.

После терапии ингибиторами некоторые показатели коагулограммы постепенно нормализовались. Из 6 обследованных больных после лечения у 5 время свертывания значительно укоротилось (у 2 почти в 2 раза) и время рекальцификации плазмы полностью нормализовалось. Введение ингибиторов фибринолиза замедлило скорость фибринолитических процессов (время лизиса эуглобулинового осадка удлинилось с 421 до 451 мин) и повысило толерантность плазмы к гепарину.

У больных с носовыми кровотечениями достоверно снизились активность фибринстабилизирующего фактора, участвующего в формировании полноценного сгустка, уровень ингибитора плазмина α_2-МГ и фибриногена. Можно отметить также некоторое уменьшение общей коагуляционной активности крови (см. табл. 32).

Применение природных и синтетических ингибиторов фибринолиза способствовало повышению коагуляционных свойств крови, толерантности плазмы к гепарину и увеличению активности фибринстабилизирующего фактора. Установлены достоверные различия в этих показателях до и после терапии ингибиторами. Время рекальцификации плазмы также уменьшалось, что свидетельствовало о повышении свертывающего потенциала крови.

При изучении коагулограммы крови у больных третьей группы (см. табл. 32) выявлены достоверные изменения времени рекальцификации и толерантности плазмы к гепарину в сторону гипокоагуляции; отмечено также снижение активности фибринстабилизирующего фактора, что свидетельствует о нарушении образования полноценного сгустка фибрина. Содержание продуктов расщепления фибриногена в плазме крови больных увеличивалось, на что указывало удлинение времени образования сгустка фибрина. В результате применения ингибиторов фибринолиза общая коагуляционная активность крови, определяемая по времени рекальцификации плазмы, а также толерантность плазмы к гепарину повышалась. Обнаружена тенденция к нор-

Таблица 32. *Данные коагулограммы крови у больных до и после лечения*

Обследуемые группы	Показатели коагулограммы ($M \pm m$)							
	время свертывания крови, с	время рекальцификации, с	протромбиновый индекс, %	концентрация фибриногена, мг%	фибринолитическая активность, мин	толерантность плазмы к гепарину, с	фибринстабилизирующий фактор, с	α_2-МГ, мг%
Первая до лечения	$409 \pm 46,2$ $P > 0,5$	$85 \pm 6,7$ $P > 0,5$	$99 \pm 7,6$ $P > 0,05$	$304 \pm 34,3$ $P > 0,05$	421 ± 61 $P > 0,2$	273 ± 47 $P > 0,2$	$134 \pm 6,6$ $P < 0,01$	$203 \pm 19,9$ $P < 0,001$
после лечения	$336 \pm 33,8$ $P_1 > 0,2$	$78 \pm 9,4$ $P_1 > 0,5$	$102 \pm 5,8$ $P_1 > 0,5$	$338 \pm 28,5$ $P_1 > 0,2$	$451 \pm 33,8$ $P_1 > 0,5$	215 ± 32 $P_1 > 0,5$	$149 \pm 7,2$ $P_1 > 0,1$	188 ± 25 $P_1 > 0,5$
Вторая до лечения	$360 \pm 30,8$ $P > 0,1$	$78 \pm 5,3$ $P > 0,5$	$99 \pm 2,2$ $P > 0,2$	$202 \pm 3,5$ $P < 0,05$	$323 \pm 21,3$ $P > 0,5$	216 ± 13 $P > 0,1$	$144 \pm 9,3$ $P < 0,001$	$228 \pm 1,71$ $P < 0,01$
после лечения	210 ± 23 $P_1 < 0,01$	$69 \pm 5,2$ $P_1 > 0,2$	$103 \pm 2,1$ $P_1 > 0,1$	273 ± 18 $P_1 < 0,001$	$369 \pm 22,4$ $P_1 > 0,1$	183 ± 15 $P_1 < 0,02$	$157 \pm 8,6$ $P_1 < 0,001$	$241 \pm 11,8$ $P_1 > 0,5$
Третья до лечения	$343 \pm 15,5$ $P < 0,001$	$125 \pm 19,4$ $P < 0,05$	$107 \pm 5,5$ $P > 0,2$	$212 \pm 13,2$ $P > 0,2$	$281 \pm 32,6$ $P > 0,05$	$312 \pm 30,6$ $P < 0,05$	149 ± 13 $P < 0,01$	$271 \pm 7,41$ $P > 0,1$
после лечения	$322 \pm 10,4$ $P_1 > 0,05$	$76 \pm 11,9$ $P_1 < 0,05$	$108 \pm 5,7$ $P_1 > 0,5$	320 ± 4 $P_1 > 0,2$	$346 \pm 18,3$ $P_1 > 0,1$	268 ± 48 $P_1 > 0,2$	145 ± 11 $P_1 > 0,5$	$255 \pm 6,6$ $P_1 > 0,1$
Норма	410 ± 11	78 ± 5	$101 \pm 1,5$	227 ± 9	$346 \pm 13,5$	$236 \pm 2,6$	$213 \pm 18,6$	286 ± 8

Примечание. P — достоверность различия между группой больных до лечения и контролем, P_1 — достоверность различия между группой больных до и после лечения.

мализации фибринолиза: нарастала концентрация фибриногена и снижалась фибринолитическая активность.

Следовательно, использование ингибиторов протеолиза и фибринолиза является патогенетически обоснованным в терапии фибринолитических кровотечений, наблюдаемых в ЛОРклинике.

Ингибиторы протеолитических ферментов при аллергических заболеваниях

Другой областью лечебного применения ингибиторов протеолиза являются аллергические заболевания верхних дыхательных путей. Как уже указывалось, при биохимической стадии аллергической реакции в результате повреждающего действия на клетки комплекса антиген — антитело освобождаются протеолитические ферменты, которые участвуют в образовании медиаторов воспалительных реакций. Протеолитические ферменты гидролизуют белки крови, при этом образуются вазоактивные кинины (брадикинин, каллидин). При развитии аллергии замедленного типа лейкоциты распадаются и освобождаются внутриклеточные протеиназы (катепсины), катализирующие образование лейкокининов. Кроме того, комплекс антиген — антитело посредством ферментных систем, в том числе и протеолитических, вызывает дегрануляцию тучных клеток и освобождение биогенных аминов — гистамина, серотонина. Указанные медиаторы вызывают гиперемию, резкий отек слизистой оболочки, гиперсекрецию ее желез и обильное пропитывание тканей транссудатом. Для подавления повышенной активности указанных энзиматических систем и снижения образования вазоактивных кининов и биогенных аминов при аллергических реакциях были предприняты попытки использовать ингибиторы протеиназ различного происхождения.

В литературе имеется ряд публикаций, показавших эффективность ингибиторов протеолиза при некоторых аллергических заболеваниях (А. Д. Адо, 1976; Berova и соавт., 1974, и др.).

В настоящее время известны клинические исследования, которые подтвердили целесообразность применения при аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей синтетических ингибиторов фибринолиза, в частности ε-АКК. В эксперименте установлено, что ε-АКК препятствует соединению антигена с антителом, разрушению тучных клеток в очаге воспаления и, следовательно, высвобождению медиаторов аллергических реакций. В 1969 г. А. М. Рындина сообщила о хороших результатах лечения ε-АКК больных аллергической формой вазомотор-

ного ринита. ε-АКК назначали больным per os (5% раствор по 1 или 2 столовые ложки каждые 4 ч на протяжении 7—21 дней; чаще всего курс лечения составлял 14 дней). Лучшие результаты были получены у больных с давностью заболевания до 1 года: они выражались в улучшении носового дыхания, прекращении обильных выделений из носа, уменьшении объема носовых раковин. Из 57 больных у 50 были получены положительные результаты. У 27 больных из 32 рецидивов не наблюдали на протяжении 6—12 мес. Положительный эффект ε-АКК у больных вазомоторным ринитом был подтвержден в исследованиях В. Х. Гербера, В. И. Тимошенского (1974). У 80 больных пероральное введение ε-АКК сочеталось с внутриносовым электрофорезом в течение 2 нед. Более эффективным лечение было у больных с длительностью заболевания не более 5 лет, при наличии в секрете носа тучных клеток и повышенной фибринолитической активности крови. Выздоровление наступило у 39 больных, у 32 отмечено улучшение, у 9 — эффекта не было. В отдаленном периоде (5 мес—2 года) из 39 больных у 10 лиц рецидивов не было, у 20 — рецидивы возникали, но реже и были менее выраженными, у 9 — рецидивы возникали как и до лечения.

Целесообразность применения ε-АКК при аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей подтверждена и другими работами (А. М. Рындина, 1975).

Нами проведены исследования по обоснованию и изучению терапевтической эффективности природных ингибиторов протеолиза, которые имеют ряд преимуществ перед синтетическими. Они оказывают поливалентное действие — тормозят протеолитические ферменты с различной субстратной специфичностью.

Клиническому применению ингибиторов предшествовали опыты по изучению влияния синтетических и природных ингибиторов на протеиназы общего и специфического действия, содержащиеся в секрете слизистой оболочки носа, а также их совместимости с другими лекарственными средствами, дополнившими ингибиторную терапию.

Данные табл. 33 показывают, что природные ингибиторы протеиназ угнетают активность протеолитических ферментов, присутствующих в секрете слизистой оболочки носа больных аллергическими ринитами, причем процент ингибирования антипротеиназами усиливается с повышением их концентрации. ε-АКК оказывает незначительное ингибирующее действие на ПРА секрета, ПАМБК не обладает антипротеолитической активностью.

Таблица 33. *Влияние природных и синтетических ингибиторов на протаминрасщепляющую активность слизистой оболочки носа (оставшаяся активность в % от исходной, принятой за 100)*

Исследуемые ингибиторы	Количество случаев	Концентрации ингибиторов, ед/мл			
		20	100	500	1000
Природные					
Трасилол	5	85	75	50	30
Контрикал	5	—	58	53	37
Синтетические					
ε-АКК	5	—	—	80	73
ПАМБК	5	—	—	100	100

Так как в носовом секрете содержатся специфические протеиназы, освобождающие кинины из кининогена (В. М. Лосицкая, Т. И. Бегунова, 1975), было изучено влияние природных антипротеиназ на кининогеназную активность секрета. Опыты показали, что она полностью инактивируется природным ингибитором протеиназ — трасилолом. Эти результаты свидетельствуют о необходимости использования природных ингибиторов протеиназ типа трасилола с терапевтической целью. Эффективность применения трасилола отмечена при лечении аллергических заболеваний, например хронической крапивницы (Berova и соавт., 1974).

Принимая во внимание роль других факторов в патогенезе аллергического ринита, в частности изменение иммунологической реактивности организма, мы считали целесообразным использовать ингибиторы в комплексе с препаратами другой направленности действия, а именно с лизоцимом как фактором неспецифического иммунитета. Включение лизоцима в состав лекарственной смеси было обусловлено также тем, что содержание его значительно снижается в тканях и биологических жидкостях при аллергических заболеваниях (Т. В. Голосова и соавт., 1968; Kowal-Gierczak и др., 1970).

В специальных опытах было установлено, что ингибитор протеиназ — трасилол не оказывал угнетающего действия на активность лизоцима, а последний не влиял на активность трасилола. Эти данные указали на возможность совместного использования ингибиторов протеиназ и лизоцима с лечебной целью.

Для более длительного воздействия предложенной лекарственной смеси на слизистую оболочку мы вводили ее больным не в водном растворе, а в виде мази. В состав мази, приготовленной на оливковом масле (10 мл), входило 25 000 ЕД трасилола

(или 10 000 ЕД контрикала) и 50 мг лизоцима. В качестве эмульгатора использован органический кремнезем метилаэросил (400 мг). Эта порция мази выдавалась больному для лечения (в сезон заболевания больной получал до 3—4 порций).

Под нашим наблюдением было 35 больных поллинозом в период ярко выраженных симптомов заболевания. В основном это были больные, ранее безуспешно лечившиеся различными методами специфической и неспецифической гипосенсибилизации. Диагноз ставился на основании характерной клинической картины, сезонности заболевания, ежегодной повторяемости обострения в течение времени года, совпадающего с периодом цветения определенных растений, положительных кожных и провокационных проб с пыльцевыми аллергенами, а также наличия у большинства больных генетической предрасположенности к аллергическим болезням.

Мазь применена нами у 20 больных с различной давностью заболевания (от 3 до 20 лет), с аллергическим процессом, клинически протекающим в основном по типу рино-конъюнктивального синдрома (К. Н. Веремеенко, 1978).

Методика применения мази проста. Больному в носовые ходы водили на 10 мин марлевую турунду, обильно пропитанную мазью. После удаления турунды больной должен как можно дольше удержать мазь в носовых ходах, периодически делая нюхательные движения с целью распространения мази в недоступные для смазывания места слизистой оболочки полости носа. Дома больной смазывал слизистую оболочку носа 3—4 раза в день. При значительном затруднении носового дыхания, а тем более при полном его отсутствии из-за отека слизистой оболочки, больной перед введением мази для лучшего ее проникновения в глубже лежащие отделы закапывал в нос сосудосуживающие средства (раствор эфедрина, галазолина, нафтизина).

Положительный эффект от применения мази, содержащей ингибитор и лизоцим, отметили 17 человек, у 3 улучшения не наступило. Эти трое больных относятся к числу тех, для лечения которых мазь содержала меньшую концентрацию ингибитора (5000 ЕД контрикала в той же порции). Облегчение состояния наступает в дни приема лекарственной смеси и длится от 3 до 6 ч после смазывания, т. е. мазь пациенты должны применять в течение всего сезона заболевания.

Положительный эффект выражается в исчезновении в носу зуда, пароксизмов чихания, уменьшении количества выделений и чувства заложенности носа (последние — в меньшей степени).

Как правило, вместе со стихаинем признаков аллергнческого риинта угасают н явлеиня конъюнктнвита без примеиеиня дополнительных лекарственных препаратов.

Учитывая положнтельный эффект применения нигнбиторов протенназ в внде мазн, мы провели клиническую проверку лечебного действия коитрнкала (илн траснлола) в составе лечебиой смесн, вводимой нигаляционым способом. Метод введеиия лекарствениых средств путем иигаляций аэрозолем рационален еще и тем, что благодаря большой всасывающей способностн слизистой оболочки дыхательных путей с его помощью можно добиться и общего эффекта.

В физнотерапевтнческнй кабииет для лечеиия ингаляцнямн иаправлялись в основиом больные, у которых заболеваиие протекало по типу рнио-бронхнальиого сннлрома (15 человек). Ингибитор протенназ (траснлол илн коитрнкал) вводнли в составе обычио нспользуемой в терапии полннозов лечебной смесн, состоящей нз суспензни гндрокортнзона н раствора димедрола. Прнмененное намн сочетанне компоиентов воздействует иа разлнчиые звенья патогенетического механизма аллергической реакцни. В связн с этнм раздельное прнменение этих нигредиентов мы не сочлн целесообразиым. Иигаляцнн проводились через иос прн обычиом режиме дыхания ежедиевно нлн через деиь. Размер аэрозольных частиц не превышал 10 мк. На протяженни 15-мниутиой процедуры больиой вдыхал около 0,5 мл 2,5% суспензин гндрокортнзона, 0,5 мл 0,5% раствора димедрола н 1,0 мл (2500 ЕД) контрнкала.

Колнчество процедур определялось клнническимн показаннямн: прн стихаиин явлеиий рниоррен, улучшеинн носового дыхаиня, нсчезиовеиин прнступов чихаиня и кашля иигаляции отмеиялись. У большинства больиых положительиый эффект (по субъектнвным даниым) отмечался иепосредствеиио во время нигаляцнн — улучшалось носовое дыхание, умеиьшалась риионрея. Стойкость улучшення варьировала от 2—4 до 1—2 сут. Прн пятидневной рабочей иеделе ухудшение наступало на 2-е сутки перерыва в приеме нигаляций. Больиые, у которых были бронхиальиые снмптомы, отмечалн уменьшеине кашля, ннтенсивиостн и частоты прнступов экспираториой одышкн.

Иигибиторы протенназ в сочетаннн с лизоцнмом оказались также эффективиыми прн лечеиин больных хроннческнм инфекциоиио-аллергическнм ринитом в пернод обострення. Предложенную смесь вводилн в нос в внде турундочек, пропнтаиных мазью, 3—4 раза в деиь, а также путем нигаляций аэрозолямн. Наряду с клиническим эффектом отмечали также повышеине активностн лнзоцима в носовом секрете. Лекарствениая смесь

не вызывает побочных реакций и может быть рекомендована для лечения поллинозов и хронических аллергических ринитов в период обострения.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ

Все излагаемые методы разработаны или апробированы в лаборатории биохимии Киевского научно-исследовательского института отоларингологии. Предложенный комплекс методов может быть использован в клинико-диагностических и научных лабораториях для целей диагностики, прогноза и характеристики эффективности лечения ЛОР- и других заболеваний.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ) И ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТАХ КРОВИ

Определение протеолитической активности плазмы (сыворотки) крови по гидролизу протаминсульфата

Плазма (сыворотка) крови содержит ферменты протеолиза с трипсиноподобной активностью, основными представителями которых являются плазмин (КФ 3.4.21.7), калликреин (КФ 3.4.21.8), тромбин (КФ 3.4. 21.5). Белковые субстраты, применяемые для определения активности препаратов протеолитических ферментов, не расщепляются протеиназами плазмы (сыворотки). Исключение составляет протаминсульфат, который гидролизуется протеолитическими ферментами плазмы (сыворотки) крови.

В основу разработанного нами метода положено определение аргинина, отщепившегося от протаминсульфата под действием протеиназ плазмы:

Реактивы:

1. Плазма крови. Кровь берут из локтевой вены сухим шприцем натощак в пробирку, содержащую 1 объем антикоагулянта (3,8% раствора лимоннокислого натрия) на 9 объемов крови. Плазму отделяют центрифугированием крови при 3000 об/мин в течение 15 мин. Гемолизированную и липоидную плазму использовать нельзя.

2. 3,8% раствор лимоннокислого Na.

3. Мединаловый буфер 0,05 М, pH 7,6. 10,3 г мединала растворяют в 500 мл дистиллированной воды, 61,5 мл этого раствора

смешивают с 38,5 мл 0,1 н HCl и добавляют дистиллированную воду до 200 мл.

4. 1% раствор протаминсульфата. Пригодны препараты субстрата с минимальным количеством аргининсодержащих пептидов. Для определения возможности использования препаратов протаминсульфата ставят пробу на наличие в них пептидов, растворимых в трихлоруксусной кислоте (ТХУ) и дающих цветную реакцию Сакагуши. С этой целью к 0,2 мл 1% раствора протаминсульфата прибавляют 0,6 мл мединалового буфера, 0,05 М, pH 7,6, и 0,8 мл 20% раствора ТХУ. Пробы центрифугируют при 5000 об/мин в течение 40 мин и в 1 мл ТХУ центрифугата определяют содержание аргинина по цветной реакции Сакагуши спектрофотометрически при 508 нм в кюветах толщиной слоя 10 мм против контроля на реактивы (0,5 мл мединалового буфета +0,5 мл 20% ТХУ + реактивы для реакции Сакагуши). Оптическая плотность пробы, характеризующая количество аргининсодержащих пептидов применяемого препарата протаминсульфата, не должна превышать 0,25. Если она выше указанного показателя, то такие препараты субстрата не пригодны. Для приготовления 1% раствора протаминсульфата непосредственно перед опытом навеску препарата тщательно растирают в 0,05 М мединаловом буфере, pH 7,6 в течение 15 мин.

5. 20% раствор ТХУ.

6. 0,02% раствор оксихинолина. 20 мг перекристаллизованного оксихинолина растворяют в 10 мл этилового спирта (96°) и хранят при температуре +4° С, перед опытом его разбавляют в 10 раз дистиллированной водой.

7. 10% раствор NaOH.

8. 1% раствор NaBrO 1 г (0,32 мл) брома растворяют в 100 мл 5% раствора NaOH.

9. 40% раствор мочевины.

10. Аргинин солянокислый. Используют для построения калибровочной кривой.

Ход определения. В 2 пробирки — опытную и контрольную — отмеривают по 0,1 мл плазмы (сыворотки) крови и 0,5 мл 0,05 М мединалового буфера, pH 7,6. В опытную пробу вносят 0,2 мл 1% раствора протаминсульфата. Обе пробы инкубируют 15 мин при температуре 35° С, после чего реакцию останавливают добавлением 0,8 мл 20% раствора ТХУ. К контрольной пробе затем прибавляют 0,2 мл протаминсульфата, предварительно выдержанного 15 мин при 35° С. После перемешивания пробы центрифугируют 45 мин при 5000 об/мин. В цельном прозрачном центрифугате определяют содержание аргинина по реакции Сакагуши следующим образом. В кони-

ческие колбы (емкостью 25—50 мл) вносят 1 мл дистиллированной воды, 1 мл центрифугата, 1 мл 0,02% раствора оксихинолина и 1 мл 10% раствора NaOH. Через 2 мин добавляют 0,2 мл 1% раствора NaBrO, спустя 15 с 1 мл 40% раствора мочевины и по истечении 45 с 1 мл дистиллированной воды. После добавления каждого реактива пробы тщательно перемешивают. Через 10 мин определяют оптическую плотность растворов при 508 нм на спектрофотометре или нефелометре ФЭКМ-56М-УН2 (кювета с толщиной слоя 10 мм), сравнивая опытную пробу с контрольной. Мерой активности фермента служит количество аргинина в пробе. Его рассчитывают по калибровочной кривой, которую строят следующим образом. 60,5 мг аргинина растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Исходный раствор содержит 1000 мкг аргинина в 1 мл. Рабочий раствор готовят путем разбавления исходного раствора до концентрации 50 мкг/мл. Калибровочная кривая строится в пределах от 5 до 40 мкг аргинина (0,1—0,8 мл) в пробе. На оси абсцисс откладывают количество аргинина (мкг), на оси ординат — показатели оптической плотности при 508 нм (рис. 13). ПРА плазмы крови выражают в мкмоль аргинина, отщепленного от протаминсульфата 100 мл плазмы за 1 мин.

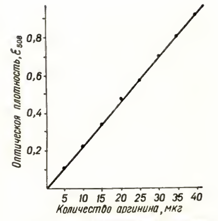


Рис. 13. Калибровочная кривая для определения аргинина.

Пример расчета. Например, оптическая плотность центрифугата равна 0,12, по калибровочной кривой это соответствует 5 мкг аргинина. Общий объем пробы — 1,6 мл, время инкубации плазмы с протаминсульфатом — 15 мин, на определение взято 0,1 мл плазмы, молекулярная масса аргинина — 174,2. Следовательно, ПРА данного образца плазмы равна:

$$\text{ПРА} = \frac{5 \cdot 1{,}6 \cdot 100}{0{,}1 \cdot 15 \cdot 174{,}2} = 3{,}1 \text{ мкмоль аргинина } /(\text{мин} \cdot 100 \text{ мл плазмы}).$$

В плазме крови здоровых людей ПРА в среднем составляет 4,2 мкмоль аргинина (колебания 2,5—6,5 мкмоль).

Определение фибринолитической активности плазмы крови

Плазма крови человека в норме обладает незначительной фибринолитической активностью, так как большая часть плазмина находится в виде неактивного предшественника — плазминогена. Последний под влиянием тканевых и бактериальных активаторов превращается в активный фермент — плазмин. Кроме того, плазминоген активируется при обработке плазмы чужеродными частицами — каолином, целитом и др. (Ogston и др., 1969). Этот контактный механизм образования плазмина осуществляется путем предварительной активации ФХ, который непосредственно или через активацию проактиваторов катализирует превращение плазминогена в плазмин.

Для определения образовавшегося плазмина в условиях контактной активации плазмы (К. Н. Веремеенко и соавторы, 1978) был разработан метод его определения с помощью субстрата протаминсульфата. Наряду с этим описан метод измерения активности плазмина по гидролизу фибрина с использованием экзогенного фибриногена.

В основу двух методов положена способность плазминогена разбавленной плазмы в кислой среде активироваться каолином. Активированный фермент (плазмин) определяется во фракции эуглобулинов плазмы по лизису сгустков фибрина и расщеплению протаминсульфата.

Определение фибринолитической активности по лизису фибриновых сгустков

В основу метода положена способность плазмина, образующегося при обработке плазмы каолином, расщеплять фибрин.

Реактивы:

1. 0,4% раствор бычьего фибриногена.
2. 1% раствор каолина.
3. 0,01 М ацетатный буфер, pH 4,8.
4. 0,5% раствор тромбина (Каунасский фармзавод).
5. Плазма крови. Взятие крови проводили в полиэтиленовые пробирки, содержащие 1 объем 1,34% раствора щавелевокислого натрия в расчете на 9 объемов крови. Плазму отделяли путем центрифугирования крови при 3000 об/мин в течение 10 мин.
6. Эуглобулиновый осадок. Его получают из плазмы крови следующим образом. В полиэтиленовые пробирки, содержащие 0,5 мл плазмы, прибавляют 9,25 мл ацетатного буфера, 0,01 М,

pH 4,8, и сразу же вносят 0,25 мл 1% суспензии каолина. Активацню плазмы каолином проводят 45 мин при 37° С, периодически перемешивая пробы деревянной палочкой. Затем их центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Центрифугат тщательно сливают, пробирку осушивают фильтровальной бумагой, а полученный эуглобулиновый осадок суспендируют в 0,5 мл 0,05 М мединалового буфера, pH 7,6. Активность образовавшегося плазмина определяют в суспензии эуглобулинов по скорости гидролиза фибрина.

Ход определения. В прозрачные полиэтиленовые пробирки вносят 0,2 мл суспензии эуглобулинов, 0,3 мл 0,05 М мединалового буфера, pH 7,6, затем добавляют 0,1 мл 0,4% раствора бычьего фибриногена и сразу же 0,1 мл 0,5% раствора тромбина помещают на водяную баню при 37°С. С момента добавления тромбина отмечают время лизиса фибриновых сгустков, которое и служит мерой фибринолитической активности плазмина. В норме оно составляет в среднем 16 мин (колебания 10—30 мин).

Определение активности плазмина
по расщеплению протаминсульфата

Метод основан на способности плазмина, образующегося при обработке плазмы каолином в кислой среде, отщеплять от протаминсульфата аргинин, количество которого служит мерой активности фермента.

Реактивы:

1. 1,34% раствор щавелевокислого Na.
2. 0,01 М ацетатный буфер, pH 4,8.
3. 1% раствор белой глины — каолина.
4. 1% раствор протаминсульфата. Его приготовление см. на с. 148,
5. 0,05 М мединаловый буфер, pH 7,6.
6. 20% раствор ТХУ.
7. 0,02% раствор оксихинолина.
8. 10% раствор NaOH.
9. 1% раствор NaBrO.
10. 40% раствор мочевины.
11. Аргинин солянокислый для построения калибровочной кривой.
12. Плазма крови.
13. Эуглобулиновый осадок; его получение см. на с. 150.

Ход определения. В опытные пробирки вносят 0,1 мл суспензии эуглобулинового осадка и 0,5 мл 0,05 М, pH 7,6 мединалового

буфера, затем прибавляют 0,2 мл 1% раствора протаминсульфата и инкубируют при температуре 37° С в течение 30 мин. Реакцию останавливают 0,8 мл 20% раствора ТХУ. Контрольные пробы проводят аналогично, но субстрат вносят после ТХУ. Контрольные и опытные пробы центрифугируют 40 мин при 5000 об/мин и в 1 мл центрифугата определяют содержание аргинина по цветной реакции Сакагуши (см. с. 148—149).

Активность каолинактивируемого плазмина (АКП) выражают в мкмоль аргинина, отщепившегося от протаминсульфата за 1 мин 100 мл плазмы крови. Ее рассчитывают по формуле:

$$АКП = \frac{C \cdot V_1 \cdot 100}{T \cdot V \cdot 174{,}2},$$

где С — количество аргинина (мкг), освободившееся из протаминсульфата и определяемое по калибровочной кривой (построение ее см. на с. 149);

V_1 — общий объем реакционной смеси (1,6 мл);

Т — время инкубации эуглобулинового осадка с протаминсульфатом (30 мин);

V — объем эуглобулиновой фракции, взятый для анализа (0,1 мл);

174,2 — молекулярная масса аргинина.

В плазме крови здоровых людей активность каолинактивируемого плазмина в среднем равна 8 мкмоль аргинина (мин · ·100 мл плазмы). (Колебания 6—11 мкмоль аргинина).

Определение активности протеолитических ферментов в лейкоцитах

Получение лейкоцитов и их гомогенизация

Реактивы:

1. 3,8% раствор цитрата натрия.
2. 0,25 М раствор сахарозы в 0,0025 М растворе $CACl_2$.
3. 1,0 М раствор сахарозы.
4. 0,9% раствор NaCl.

Лейкоциты выделяли из венозной крови следующим образом. В узкую пробирку к 1,33 мл 3,8% цитрата Na прибавляли 12 мл крови, осторожно перемешивали и оставляли в воздушном термостате при 37° С на 1,5—2 ч для осаждения эритроцитов. По истечении этого времени верхний слой плазмы со взвешенными в ней лейкоцитами осторожно отбирали пастеровской пипеткой, клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин при комнатной температуре в центрифуге ЦУМ-1 в течение 10 мин и

надосадочную жидкость осторожно сливали. Осадок состоял из лейкоцитов и примеси эритроцитов. Последние разрушали гипотоническим шоком по методу Д. П. Панавене и С. Ю. Банджюлене (1975). Для этого осадок лейкоцитов суспендировали в 1,5 мл 0,25 М раствора сахарозы в 0,0025 М растворе $CaCl_2$ и прибавляли к взвеси 4,5 мл дистиллированной воды. Хорошо перемешивали в течение 25 с и восстанавливали изотоничность раствора добавлением 1,5 мл 1 М сахарозы. Лейкоциты осаждали центрифугированием, как описано выше. Контроль за чистотой препаратов лейкоцитов осуществляли в мазках, окрашенных по Романовскому — Гимзе. При обнаружении неразрушенных эритроцитов гипотонический шок их вызывали еще раз.

Перед определением ферментативной активности осадок лейкоцитов суспендировали в 2 мл 0,9% раствора NaCl, подсчитывали количество лейкоцитов в камере Горяева и затем добавляли к взвеси такое количество физиологического раствора, чтобы в 1 мл ее содержалось 2—4 млн. клеток.

Взвесь лейкоцитов гомогенизировали при охлаждении в модифицированном размельчителе тканей РТ-2 с тефлоновым пестиком и стаканом в течение 1 мин. Зазор между стенкой стакана и поверхностью пестика составлял 0,2 мм, высота пестика — 4 см. В этих условиях объем пространства вокруг пестика равен 1 мл. Достаточно высокая интенсивность гомогенизации при скорости вращения пестика 3000 об/мин обеспечивается при помещении в этот объем 0,5 мл суспензии клеток.

Определение активности кислых протеиназ по расщеплению субстрата гемоглобина

Метод основан на определении количества тирозина, освобождающегося под действием протеолитических ферментов лейкоцитов из гемоглобина. Данный метод может быть использован для определения общей протеолитической активности как в кислой, так и в слабощелочной среде.

Нами использован метод определения общей активности кислых протеиназ — катепсиноподобных ферментов (Нортроп и соавт., 1950).

Реактивы:

1. 2,5% раствор лиофиллизированного бычьего гемоглобина в дистиллированной воде.
2. 1,35 М водный раствор уксусной кислоты.
3. 5% раствор ТХУ.

Ход определения. К 2 мл 2,5% раствора гемоглобина прибавляли 0,5 мл раствора 1,35 М уксусной кислоты. Эту смесь

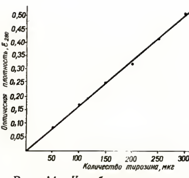


Рис. 14. Калибровочная кривая для определения тирозина.

(pH 3) преинкубировали в течение 10 мин при 37° С, прибавляли к ней 0,5 мл гомогената лейкоцитов (примерно 1 мг белка) и инкубировали при 37° С в течение 3 ч. Реакцию прекращали прибавлением 5 мл 5% раствора ТХУ. Пробы оставляли стоять при комнатной температуре в течение 30 мин и затем фильтровали через бумажные фильтры. Опытные пробы спектрофотометрировали (СФ-4, СФ-4А, СФ-16 и др.) против контрольных при длине волны 280 нм. В контрольные пробы источник фермента прибавляли после добавления ТХУ. Количество отщепленного тирозина определяли по калибровочной кривой (рис. 14).

Удельная активность (УА) кислых протеиназ выражалась в мкмоль тирозина/ (ч·мг белка). Расчет проводили по следующей формуле:

$$УА = \frac{А}{Б \cdot 181,2 \cdot В},$$

где А — количество тирозина в мкг, соответствующее полученной при измерении на спектрофотометре разнице в поглощении опытной и контрольной проб (ΔE_{280});

Б — количество белка в пробе в мг;

В — время инкубации в ч;

181,2 — молекулярная масса тирозина.

Пример расчета: разница в поглощении между опытной и контрольной пробами (ΔE_{280}) составляет 0,25. По калибровочной кривой это соответствует 150 мкг тирозина. Количество белка в пробе — 0,9 мг, время инкубации — 3 ч. В данном случае УА будет равна

$$УА = \frac{150}{0,9 \cdot 3 \cdot 181,2} = 0,31 \text{ мкмоль тирозина/ (ч · мг белка).}$$

Количество белка в пробе определяли методом Lowry и соавторов (1951).

Определение количества белка методом Lowry и соавторов (1951)

Реактивы:

1. Реактив № 1. 2% раствор Na_2CO_3 б/в в 0,1 н. растворе NaOH;
2. Реактив № 2. 2% раствор K-Na-виннокислого;
3. Реактив № 3. 1% раствор $CuSO_4$;
4. Реактив № 4. Перед употреблением смешивают 50 мл реактива № 1 с 1 мл смеси (0,5 мл реактива № 2 и 0,5 мл реактива № 3);
5. Реактив № 5. Реактив Фолина. Вносят 100 г $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 25 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ и 700 мл дистиллированной воды в круглую термостойкую колбу (1,5—3 л); при охлаждении прибавляют 50 мл 8,5% ортофосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl. Снабжают колбу обратным холодильником и осторожно нагревают смесь в течение 10 ч (очень слабое кипение). В конце периода нагревания прибавляют 150 г сульфата лития (Li_2SO_4), 50 мл дистиллированной воды и несколько капель жидкого брома. Нагревают смесь без обратного холодильника около 15 мин для удаления брома. Охлаждают, разводят до 1 л и фильтруют через стеклянную вату. Затем раствором 0,1 н. NaOH реактив Фолина титруют по фенолфталеину для установления в нем концентрации кислоты (1 мл реактива Фолина, 50 мл дистиллированной воды и несколько капель 1% спиртового раствора фенолфталеина). На нейтрализацию 1 мл реактива Фолина требуется около 20 мл 0,1 н. NaOH. Перед употреблением реактив Фолина разводят так, чтобы его конечная кислотность соответствовала 1 н. (примерно в 2 раза).

Ход определения. 1 мл раствора белка помещают в пробирку, приливают 5 мл реактива № 4 и выдерживают при комнатной температуре 15 мин. После этого добавляют 0,5 мл разведенного реактива Фолина, сразу тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем пробу колориметрируют на фотоэлектроколориметре (красный светофильтр, 750 нм) против контроля. Контролем служит проба, в которую вместо раствора белка помещается 1 мл дистиллированной воды и приливаются остальные реактивы в обычной последовательности. По величине оптической плотности (E_{750}) определяют количество белка в пробе по калибровочной кривой, используя в качестве стандарта раствор сывороточного альбумина. При построении кривой к различным концентрациям сывороточного альбумина — 25—200 мкг в 1 мл — прибавляют все необходимые реактивы в описанной выше последовательности;

Таблица 34. *Калибровочная кривая для определения содержания белка*

Количество (в мкг) бычьего сывороточного альбумина в 1 мл	E_{750}
25	0,07
50	0,14
75	0,20
100	0,26
125	0,32
150	0,39
175	0,44
200	0,49

общий объем — 6,5 мл. Затем на оси абсцисс откладывают количество белка в пробе, а на оси ординат — величины оптической плотности соответствующей пробы при длине волны 750 нм. Данные для построения калибровочной кривой приведены в табл. 34.

Определение протеолитической активности по расщеплению синтетического субстрата БАЭЭ

Метод основан на определении скорости гидролиза БАЭЭ протеиназами лейкоцитов. Количество гидролизованного БАЭЭ определяют в реакции с гидроксиламином, комплексы которого с БАЭЭ в кислой среде с $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ дают окрашенные соединения.

Реактивы:

1. 0,02 М раствор БАЭЭ (0,34 г вещества растворяют в 50 мл дистиллированной воды).

2. 0,1 М мединаловый буфер, pH 7,8 (10,3 г веронала Na растворяют в 500 мл дистиллированной воды; 66,2 мл этого раствора смешивают с 33,8 мл 0,1 М HCl). Реакцию среды контролируют на pH-метре.

3. Щелочной раствор гидроксиламина (13,9% гидроксиламин гидрохлорида нейтрализуют равным объемом 14% раствора NaOH). Этот раствор готовится непосредственно перед употреблением.

4. 3 н. раствор HCl.

5. 10% раствор хлорного железа ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) в 0,1 н. растворе HCl.

6. 10% раствор ТХУ.

Ход определения. В центрифужных пробирках к 1 мл раствора БАЭЭ прибавляют 1 мл мединалового буфета, pH 7,8, и преинкубируют на водяной бане при 37°С в течение 10 мин. Затем добавляют 0,5 мл гомогената (0,2—0,4 мг белка) лейкоцитов и инкубируют в течение 3 ч при той же температуре. По истечении этого времени в опытные пробирки прибавляют 1,5 мл 10% раствора ТХУ.

В контрольные пробирки гомогенат лейкоцитов прибавляют после добавления ТХУ. Содержимое каждой пробирки размешивают, оставляют стоять в течение 5 мин и затем центри-

фугируют при 300 об/мин в течеиие 10 мии. Затем в пробирки отбирают 2 мл прозрачиой иадосадочной жидкости, добавляют к ией 2 мл щелочиого раствора гидроксиламииа и через 1 мии — 1 мл 3 и. раствора HCl, хорошо перемешивают и прибавляют 2 мл 10% раствора хлориого железа. Через 15 мии пробы спектрофотометрируют против коитрольиых при длиие волны 540 нм. В контрольиые пробы вместо иадосадочиой жидкости помещают 2 мл дистиллироваииой воды. По разиице в оптической плотиости (ΔE_{540}) коитрольиых и опытиых проб определяют с помощью калибровочной кривой (рис. 15) количество расщепившегося БАЭЭ. Удельиую активиость выражают в мкмоль расщепившегося БАЭЭ (ч·мг белка) и рассчитывают по формуле:

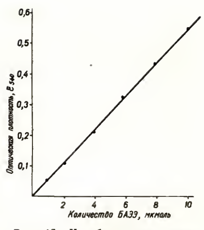


Рис. 15 Калибровочиая кривая для определения БАЭЭ.

$$УА = \frac{А \cdot 2}{Б \cdot В},$$

где А — количество БАЭЭ в мкмоль;
Б — количество белка в пробе в мг;
В — время инкубации в ч;
2 — расчет иа весь объем пробы.

Пример расчета: разница в поглощении коитрольной и опытиой проб (ΔE_{540}) составляет 0,165. По калибровочиой кривой это соответствует 3 мкмоль БАЭЭ. Время иикубации — 3 ч, количество белка в пробе — 0,3 мг. В даииом случае:

$$УА = \frac{3 \cdot 2}{0,3 \cdot 3} = 6,7,$$

мкмоль расщепившегося БАЭЭ/ ч·мг белка.

Количество белка в пробе определяют методом Lowry и соавторов (1951). Подробиое описаиие этого метода даио выше.

Определение ингибиторов плазмина в плазме крови

Для характеристики состояния фибринолитической системы крови наряду с изучением активности ее основного фермента — плазмина — важное значение имеет исследование содержания веществ, регулирующих его каталитическую функцию,— ингибиторов.

В основу разработанного нами метода положена способность ингибиторов плазмы крови тормозить фибринолитическую активность каолинактивируемого плазмина. Мерой активности ингибиторов служит увеличение времени лизиса фибринового сгустка (мин). В качестве источника фермента служила фракция эуглобулинов, полученная при активации плазмы доноров в кислой среде каолином.

Для проведения исследования по данной методике необходимы те же реактивы, что и для определения активности плазмина по лизису фибринового сгустка (см. с. 150).

Ход определения. В две прозрачные полиэтиленовые пробирки вносили 0,2 мл суспензии эуглобулинов (полученных по методу, описанному на с. 150—151) и 0,2 мл плазмы, разбавленной 0,05 М мединаловым буфетом, рН 7,6, в 40 раз. Объем проб доводили до 0,5 мл мединаловым буфером, рН 7,6, и преинкубировали 15 мин при 20° С для образования комплекса плазмин — ингибитор. Затем к пробам прибавляли 0,1 мл 0,4% раствора бычьего фибриногена и сразу же 0,1 мл 0,5% раствора тромбина. Параллельно ставили контрольную пробу, в состав которой входили 0,2 мл суспензии эуглобулинов, 0,3 мл 0,05 М мединалового буфера, рН 7,6, 0,1 мл 0,4% раствора фибриногена и 0,1 мл 0,5% раствора тромбина. Отмечали время лизиса фибриновых сгустков.

Содержание ингибиторов плазмина (ИП) рассчитывали по формуле:

$$ИП = \frac{t - t_0}{t_0} \cdot K,$$

где t — время лизиса в опыте в присутствии ингибиторов (мин);

t_0 — время лизиса в контроле (без ингибитора);

К — коэффициент пересчета на 1 мл плазмы. Уровень ингибиторов выражают в условных единицах. При расчете берут среднюю величину, полученную в опытах с 0,2—0,3 мл плазмы.

Пример расчета. Время лизиса в контрольной пробе равно 10 мин. В опытной пробе с 0,2 мл плазмы оно составило 18 мин. Плазма разбавлена в 40 раз. Содержание ингибитора равно:

$$\frac{(18 - 10) \cdot 40}{10 \cdot 0,2} = 160 \text{ усл. ед.}$$

В 1 мл плазмы здоровых людей в среднем 240 усл. ед. ингибиторов плазмина (колебания 80—520 усл. ед.).

Кроме плазмы крови ингибиторы плазмина можно определять и в слюне. При этом к суспензии эуглобулинов вносили от 0,1 до 0,3 мл слюны (надосадочной жидкости, полученной при центрифугировании слюны при 3000 об/мин) или секрета околоушной железы. В норме количество ингибиторов плазмина в 1 мл слюны составляет от 1 до 10 усл. ед., в секрете околоушной железы — от 1 до 5 усл. ед.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови

ЛДГ в процессе анаэробного распада углеводов (гликолизе) катализирует обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную. Коферментом в данной реакции является никотинамидадениндинуклеотид (НАДН·H^+).

Метод основан на уменьшении поглощения НАДН·H^+ в процессе превращения пировиноградной кислоты в молочную при длине волны 340 нм и температуре 37° С — оптический тест Варбурга (Л. М. Пырков и соавт., 1970).

Реактивы:

1. 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,6, его приготавливают путем сливания 90 мл 0,2 М раствора Na_2HPO_4 (28,4 г растворяют в 1000 мл дистиллированной воды) и 10 мл 0,2 М раствора KH_2PO_4 (27,2 г растворяют в 1000 мл дистиллированной воды) и добавлением к этой смеси 100 мл дистиллированной воды. рН раствора контролируется с помощью рН-метра.
2. Раствор НАДН·H^+ —4,5 мг в 1,5 мл дистиллированной воды.
3. Раствор пировиноградиокислого Na — 7,5 мг в 3 мл дистиллированной воды.
4. 0,9% раствор NaCl.

Ход определения. В пробирку вносят 2,7 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4, 0,1 мл раствора НАДН·H^+ и 0,1 мл сыворотки, а в кювету от спектрофотометра — 0,1 мл раствора пировиноградиокислого Na. Пробирку и кювету помещают в водяной термостат при 37° С на 5 мин. Затем выливают содержимое пробирки в кювету и с максимальной быстротой измеряют в спектрофотометре поглощение смеси при длине волны 340 нм против контрольной пробы (кюветы с дистиллированной водой). Затем опытную кювету снова помещают в водяной термостат и через каждые 2 мин в течение 6 мин измеряют поглощение смеси. В процессе реакции наблюдается постепенное уменьшение опти-

ческой плотиости ввиду сиижения в пробе количества НАДН·Н+ (он превращается в НАД — никотинамиддииуклеотид окисленный), имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм. НАД, как известио, при этой длине волны имеет максимальное поглощеиие. Сиижение оптической плотиости (ΔE_{340}) за каждые 2 мии должио равияться 0,04—0,08. При большей активности фермента сыворотку соответствующим образом разводят 0,9% раствором NaCl.

Активность выражают в мкмоль субстрата (мин·1000 мл сыворотки).

Для расчета активности фермента (АФ) применяется следующая формула:

$$АФ = \frac{А \cdot 0{,}483 \cdot 1000}{0{,}1},$$

где А — средиее сиижение оптической плотности (ΔE_{340}) за 1 мии;

0,483 — коэффициент пересчета оптической плотиости в мкмоль,

1000 — 1000 мл сыворотки,

0,1 — количество мл сыворотки в пробе.

Пример расчета. Трехкратио измереииое сиижение оптической плотности за каждые 2 мин составляло соответствеиио 0,06; 0,06 и 0,05. Средиее сиижение оптической плотиости в пробе за 1 мин в даиином случае будет $\frac{0{,}06 + 0{,}06 + 0{,}05}{2 \cdot 3} = 0{,}028$. Активиость ЛДГ 1000 мл сыворотки составит: $\frac{0{,}028 \cdot 0{,}483 \cdot 1000}{0{,}1}$, что равио 135,24 мкмоль/мии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В СЕКРЕТАХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА

Определение протеолитической активности слюны по расщеплению протаминсульфата

Метод определеиия протеолитической активиости плазмы крови по гидролизу протамиисульфата можио использовать и для определеиия протеииаз в другой биологической жидкости — слюне и секрете слюниых желез.

Принцип метода, используемые реактивы для слюны такие же, как и для плазмы крови (см. с. 147—148).

Объектом исследоваиия может служить как смешаииая слюиа, полученная натощак (без раздражителя), отдельные ее фракции (жидкая часть, осадок), получеииые при цеитрифугировании

слюны при 3000 об/мин, так и секрет околоушной железы. Его собирают натощак путем раздражения железы 2% раствором лимонной кислоты при помощи капсулы Красногорского — Ющенко.

Ход определения. В опытные пробирки вносят 0,25 мл смешанной слюны (надосадочной жидкости) или секрета околоушной железы, затем добавляют 0,55 мл 0,05 М мединалового буфера, pH 7,6, и 0,2 мл 1% раствора протаминсульфата. Опытные пробы инкубируют в водяном термостате при 35° С в течение 30 мин, затем прибавляют 1 мл 20% раствора ТХУ. Контрольные пробы исследуют аналогично, но 0,2 мл протаминсульфата, инкубированного 30 мин при 35° С, добавляют после ТХУ. После 45-минутного центрифугирования проб при 5000 об/мин в безбелковых центрифугатах определяют количество аргинина, как описано на с. 149.

ПРА слюны (секрета) выражают в нмоль аргинина, освобожденного из протаминсульфата под действием 1 мл (или мг белка) слюны (секрета) за 1 мин.

Пример расчета. Оптическая плотность опытной пробы составляет 0,17, что по калибровочной кривой соответствует 7 мкг аргинина. Общий объем пробы — 2 мл, время инкубации — 30 мин, на определение брали 0,25 мл слюны, молекулярная масса аргинина — 174,2, в 1 мл слюны (секрета) содержится 1,2 мг белка, 1000 — коэффициент пересчета на нмоль. Следовательно, ПРА данного образца слюны равна:

$$\frac{7 \cdot 2 \cdot 1000}{0{,}25 \cdot 30 \cdot 174{,}2} = 10 \text{ нмоль аргинина/ (мл слюны} \cdot \text{мин).}$$

$$\frac{7 \cdot 2 \cdot 1000}{0{,}25 \cdot 30 \cdot 174{,}2 \cdot 1{,}2} = 8{,}3 \text{ нмоль аргинина/ (мг белка} \cdot \text{мин).}$$

В норме ПРА смешанной слюны составляет в среднем 9,1 нмоль аргинина/ (мл слюны·мин), удельная активность — 7,1 нмоль/(мг белка·мин). ПРА секрета околоушной железы у здоровых людей равна 2,6 нмоль/ (мл секрета·мин), удельная активность 3,1 нмоль/ (мг белка·мин).

Определение БАЭЭ-эстеразной активности слюны

Метод основан на том, что протеиназы смешанной слюны и секрета околоушной железы расщепляют БАЭЭ. Образовавшийся при этом бензоил-α-аргинин (БА) при длине волны 253 нм имеет более высокую величину молярного коэффициента экстинции, чем растворы БАЭЭ. Количество отщепившегося в ходе фер-

ментатнвиой реакцнн БА является мерой эстеразной актнвностн протеолитнческих ферментов слюны.

Реактивы:

1. Надосадочная жидкость слюны, полученная при ее 10-минутном центрифугнрованнн прн 3000 об/мин. Секрет околоушиой железы. Забор его осуществлялн, как опнсывалось раиее (с. 160—161).

2. Трнс-HCl-буферный раствор, 0,05 М, pH 8. Для получения буферного раствора смешивают 50 мл 0,2 М раствора трнса (24,2 г в 1000 мл дистнллированной воды) н 26,8 мл 0,2 М HCl. Объем доводят дистнллированной водой до 200 мл.

3. БА, $0{,}75 \cdot 10^{-3}$М (молекулярная масса 278,3). Используют как стандартный препарат для построения калибровочиого графнка. 20,85 мг этого вещества растворяют в 100 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8.

4. БАЭЭ — HCl, $0{,}75 \cdot 10^{-3}$ М (молекулярная масса 342,8). Готовят непосредствеино перед проведением опыта. 25,7 мг БАЭЭ-HCl растворяют в 100 мл 0,05 М трнс-HCl-буферного раствора, pH 8.

Ход определения. В опытные пробы берут 0,25 мл слюны (надосадочной жидкостн) нлн секрета околоушиой железы и добавляют 1,75 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 8. В контрольную пробу вносят 2 мл буфера. Пробы н субстрат — БАЭЭ выдерживают на водяиой баие 10 мин прн температуре 25°С. Затем к контрольной н опытиым пробам добавляют по 1 мл БАЭЭ н сразу же нзмеряют оптнческую плотность опытной пробы протнв контрольной в кювете ширнной 10 мм на спектрофотометре прн длине волны 253 нм. При линейиой завнсимостн определеиие проводят каждые 5 мии в течеине 30 мнн. Активиость фермента выражают в нмоль БА, образовавшегося в результате гндролиза БАЭЭ 1 мл слюны (мг белка) за 1 мии.

Для перехода от оптической плотностн к колнчеству образовавшегося БА строят калибровочную крнвую. С этой целью готовят серню растворов БАЭЭ н БА в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 8,0), в 1 мл которых будет содержаться 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 мкмоль указанных веществ. Затем измеряют оптнческую плотность растворов прн длине волиы 253 им в кювете с толщиной слоя 10 мм протнв 0,05 М трнс-HCl-буфера, pH 8. Вычисляют разиость показателей оптической плотиости растворов БА н БАЭЭ одииаковой коицеитрацни (ΔE_{253}БА—БАЭЭ) н вычерчивают калибровочиую кривую. Откладывают на осн ордиииат разность показателей оптнческих плотностей растворов БА н БАЭЭ, а на оси абсцнсс — соответствующне нм количества БА в мкмоль иа 1 мл (рис. 16).

Пример расчета. Прирост оптической плотности опытных растворов за 1 мин равен 0,10, что соответствует 0,095 мкмоль БА, объем пробы 3 мл, для определения взято 0,25 мл слюны, 1000 — коэффициент пересчета на нмоль.

Следовательно, БАЭЭ-эстеразная активность слюны равна $\frac{0,095 \cdot 3 \cdot 1000}{0,25 \cdot 30} = 38$ нмоль БА/(мл слюны·мин). Для вычисления удельной БАЭЭ-эстеразной активности полученный результат делят на количество мг белка слюны. БАЭЭ-эстеразная активность слюны практически здоровых людей равна 23±1,8 нмоль/ (мл слюны·мин), удельная активность составляет 25±2,8 нмоль БА/ (мг белка·мин), БАЭЭ-эстеразная активность секрета околоушной железы равна 9,4 нмоль БА/ (мл·мин), удельная активность — 12 нмоль БА/ (мг белка·мин).

Рис. 18. Калибровочная кривая для определения бензоил-*L*-аргинина.

Определение активности щелочной и кислой фосфатазы в слюне

Фосфатазы — ферменты, катализирующие отщепление фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. В зависимости от pH среды, при котором фосфомоноэстераза наиболее активна, различают несколько ее видов. Клиническое значение имеют исследования уровня активности щелочной фосфатазы или фосфомоноэстеразы I (КФ 3.1.3.1) и кислой фосфатазы или фосфомоноэстеразы II (КФ 3.1.3.2).

Метод основан на способности фосфатазы слюны при определенных условиях гидролизовать эфирную связь в паранитрофенилфосфате. Освобождающийся паранитрофенол в щелочной среде дает желтое окрашивание. Интенсивность окраски отражает активность фермента.

Реактивы:

1. Субстратный раствор паранитрофенилфосфата (натриевой соли) готовят в день проведения реакции из расчета 1 мг в 1 мл H_2O.
2. 0,15 М аммиачный буфер (pH 10,0), применяемый для определения щелочной фосфатазы, готовят путем смешивания 85 мл

0,15 M NH_4OH и 15 мл 0,15M NH_4Cl. Проверяют pH раствора с помощью потенциометра. Раствор сохраняют при температуре +4° C.

3. 0,2 M ацетатный буфер (pH 4,8) используется при определении кислой фосфатазы. Буферный раствор готовят путем смешивания 40 мл 0,2 M раствора уксусной кислоты и 60 мл 0,2 M уксуснокислого Na, pH проверяют потенциометрически. Хранят раствор в холодильнике при +4° C.

4. Стандартный раствор паранитрофенола, используемый для построения калибровочной кривой. 6,96 мг паранитрофенола растворяют в 1000 мл 0,02 н. раствора NaOH.

5. 1,0 н. и 0,02 н. NaOH.

6. Смешанная слюна. Ее получают без раздражителя, муцины и клеточные элементы удаляют путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин и в надосадочной фракции определяют активность фосфатаз.

Ход определения. Щелочная фосфатаза. В две пробирки вносят по 0,8 мл 0,15 M аммиачного буфера (pH 10,0) и 0,5 мл субстрата паранитрофенилфосфата, пробы помещают на 5 мин в водяной термостат при температуре 37° C. Затем в одну из пробирок (опытную) прибавляют 0,2 мл слюны. Вторая пробирка служит контролем на реактивы. Пробы инкубируют 60 мин при 37° C. По окончании срока инкубации в обе пробирки добавляют 0,5 мл 1,0 н. NaOH, а в контрольную пробу вносят 0,2 мл слюны. Объем проб доводят до 5,5 мл H_2O. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете толщиной 10 мм против контроля.

Кислая фосфатаза. Ход анализа такой же, как и при определении щелочной фосфатазы, но вместо аммиачного буфера используют 0,2 M ацетатный буфер, pH 4,8.

Количество отщепившегося во время ферментативной реакции паранитрофенола находят по заранее составленной калибровочной кривой.

Построение калибровочой кривой. 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл стандартного раствора, содержащего соответственно 0,05—0,25 мкмоль паранитрофенола, с помощью 0,2 н. раствора NaOH доводят до объема 5,5 мл и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре против 0,02 н. раствора NaOH. На основании полученных результатов строят калибровочную кривую, откладывая на оси ординат значения показателей оптической плотности при 400 нм, а на оси абсцисс — количество мкмоль паранитрофенола (рис. 17).

Активность фосфатазы (щелочной, кислой) выражают коли-

чеством нмоль паранитрофенола, освободившегося под влиянием 1,0 мл слюны за 1 мин при температуре 37° С.

Пример расчета. Оптическая плотность (E_{400}) пробы щелочной фосфатазы равна 0,280, что соответствует согласно кривой 0,08 мкмоль паранитрофенола. 0,2 — количество (мл) взятой в опыт слюны, 60 — время инкубации (мин), 1000 — коэффициент пересчета единиц активности фермента в нмоль паранитрофенола. «Е» пробы кислой фосфатазы соответствует 0,600, что равно согласно кривой 0,175 мкмоль паранитрофенола.

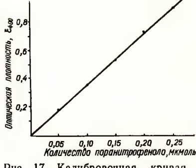


Рис. 17. Калибровочная кривая для определения паранитрофенола.

Следовательно, активность щелочной фосфатазы $= \frac{0{,}08 \cdot 1000}{0{,}2 \cdot 60} =$

$=6$ нмоль паранитрофенола/ (мин·мл);

активность кислой фосфатазы $\frac{0{,}175 \cdot 100}{0{,}2 \cdot 60} = 14$ нмоль паранитрофенола/(мин·мл).

Активность щелочной фосфатазы слюны у взрослых практически здоровых людей в среднем равна 6 нмоль паранитрофенола/ (мин·мл), а кислой фосфатазы 14 нмоль паранитрофенола/ (мин·мл).

Определение протеолитической активности в секрете слизистой оболочки носа по гидролизу протаминсульфата

Принцип метода и используемые реактивы см. с. 147—148.

Для получения секрета слизистой оболочки носа в носовые ходы правой и левой половины носа на 10—15 мин вводят марлевые турунды, смоченные в физиологическом растворе. Механическое раздражение слизистой носа вызывает усиленную секрецию ее отделяемого. Пропитанные отделяемым слизистой оболочки носа турунды после удаления из носа помещают в полиэтиленовые пробирки с 2 мл 0,85% раствора NaCl. После экстрагирования секрета 0,85% физиологическим раствором в течение 30—40 мин при температуре 4° С турунды тщательно отжимают и используют секрет для определения протеолитической активности.

Ход определения. В опытную пробу вносят 0,2 мл цельного секрета, 0,4 мл 0,05 М мединалового буфера, pH 7,6, а затем

прибавляют 0,2 мл 1% раствора протамиисульфата. Пробы инкубируют 60 мин при 35° С, после чего реакцию остаиавливают добавлением 0,8 мл 20% раствора ТХУ. Контроль проводят аиалогичио, ио ТХУ виосят перед добавлением протамиисульфата. После цеитрифугироваиия проб при 5000 об/мии в течеиие 45 мин в прозрачиом ТХУ фильтрате определяют количество аргииииа (см. с. 149). ПРА секрета выражают в имоль аргинина/ (мг белка секрета·мин).

Пример расчета. Оптическая плотиость опытиой пробы равна 0,05, что по калибровочиой кривой соответствует 1,8 мкг аргииииа, общий объем пробы — 1,6 мл, иикубация секрета с протамиисульфатом — 60 мии. 174,2 — молекуляриая масса аргииииа; 0,2 мл секрета — взято в пробу, 1,1 мг — количество белка в 1 мл; 1000 — коэффициеит пересчета иа имоль.

$$\text{ПРА} = \frac{1,8 \cdot 1,6 \cdot 1000}{0,2 \cdot 174,2 \cdot 60 \cdot 1,1} = 1,2 \text{ нмоль аргинина/ (мг белка} \cdot \text{мин).}$$

Определение лицозима в слюне и секретах слизистой носа

Метод осиоваи иа способиости лизоцима слюиы и секретов слизистой оболочки иоса расщеплять полисахариды клеточиой оболочки бактерий Micrococcus Lysodeikticus. Активиость фермеита определяют иефелометрически по измеиеиию мутиости суспеизии Micrococcus Lysodeikticus.

Реактивы:

1. Ацетоиовый порошок культуры M. Lysodeikticus (Олайнский завод). 20 мг препарата тщательио растирают в небольшом объеме $^1/_{15}$ М фосфатиого буфера, pH 6,25, затем приливают буфер до объема 100 мл.

2. $^1/_{15}$ М K-Na-фосфатиый буфер, pH 6,25. 136,15 г KH_2PO_4 (1 М) растворяют в 1000 мл дистиллированиой воды. 178,4 г двузамещенного Na_2HPO_4 (1 М) растворяют в 1000 мл дистиллированиой воды. Смешивают 70 мл KH_2PO_4 (1 М) и 30 мл Na_2HPO_4 (1 М), затем разбавляют полученный буфер до коицентрации $^1/_{15}$ М. pH раствора коитролируется при помощи pH-метра.

3. Кристаллический лизоцим. 5 мг препарата растворяют в 5 мл $^1/_{15}$ М фосфатиого буфера, pH 6,25 (исходиый раствор). Его хранят в холодильиике в течение 2 иед при +4° С. Непосредствеиио перед опытом исходиый раствор разбавляют фосфатиым буфером до коицентрации 2 мкг/мл.

4. Смешаииая слюиа.

5. Секрет слизистой иоса. Их получеиие см. на с. 160, 165.

Ход определения. В опытные пробы вносят по 0,1 мл смешанной слюны, разбавленной в 2 раза 0,9% раствором NaCl (или 0,1 мл секрета слизистой носа), прибавляют 0,9 мл $^1/_{15}$ M фосфатного буфера, pH 6,25, и 5 мл субстрата — Micrococcus Lysodeikticus. Пробы инкубируют 30 мин при 37° C, после чего сразу же фотометрируют против $^1/_{15}$ M фосфатного буфера, pH 6,25, на нефелометре ФЭКН-57 в кюветах с толщиной слоя 10 мм при использовании светофильтра № 10. Активность исследуемого фермента слюны (секрета) выражают в мкг кристаллического лизоцима/мг белка за 30 мин инкубации при 37° C. Для перехода от показателей светопропускания к количеству (мкг) лизоцима строят калибровочную кривую. Для этого берут серию пробирок, в которые вносят от 0,2 до 1 мл лизоцима (0,2—2 мкг), доводят объем проб до 1 мл $^1/_{15}$ M фосфатным буфером, pH 6,25, и добавляют 5 мл M. Lysodeikticus. Контрольная проба состоит из 1 мл $^1/_{15}$ M фосфатного буфера, pH 6,25, и 5 мл M. Lysodeikticus. После инкубации опытных и контрольных проб в течение 30 мин при 37° C их фотометрируют на ФЭКН-57 против $^1/_{15}$ M фосфатного буфера, pH 6,25. На основании полученных данных строят калибровочную кривую (рис. 18). На оси абсцисс откладывают количество лизоцизма в пробе (мкг), на оси ординат — процент светопропускания.

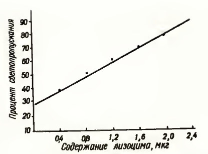


Рис. 18. Калибровочная кривая для определения лизоцима.

Пример расчета. Процент светопропускания опытной пробы равен 70, что по калибровочной кривой соответствует 1,6 мкг лизоцима. В пробу брали 0,1 мл слюны, разбавленной в 2 раза, содержание белка слюны — 2 мг.

$$\text{Содержание лизоцима} = \frac{1,6 \cdot 1 \cdot 2}{0,1 \cdot 2} = 8 \text{ мкг/мг белка.}$$

В норме уровень лизоцима в слюне составляет 15 мкг/мг белка, в секрете слизистой носа — 45 мкг/мг белка.

Определение активности ЛДГ в секретах слюнных желез

Активность ЛДГ исследовали в центрифугатах смешанной слюны (3000 об/мин в центрифуге ЦУМ-1, 10 мин) и секрете околоушной железы методом, описанным выше (с. 159).

В пробу брали 0,1 мл слюны. Центрифугаты смешанной слюны разводили 0,9% раствором NaCl в 2—3 раза для получения оптимального снижения экстинции (0,04—0,08) за каждые 2 мин измерения. Активность фермента в секретах околоушной железы выявлялась в следовых количествах. На определение брали 0,1 мл цельного секрета.

Удельную активность ЛДГ выражали в мкмоль субстрата мин·мг белка.

Количество белка определяли методом Lowry и соавторов (1951), как описано выше (с. 155).

Расчет проводили по формуле:

$$\text{активность ЛДГ} = \frac{А \cdot 0{,}483}{Б},$$

где А — снижение оптической плотности (ΔE_{340}) за 1 мин;

0,483 — коэффициент пересчета оптической плотности в мкмоль;

Б — количество белка в пробе в мг.

Пример расчета. Оптическая плотность (ΔE_{340}) за 1 мин равняется 0,033. Количество белка в пробе в данном опыте составляло 0,049 мг. Подставив эти данные в формулу $\frac{0{,}033 \cdot 0{,}483}{0{,}049}$, получаем значение активности 0,32 мкмоль/(мин·мг белка).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Определение активности ЛДГ в биопсийном материале

Обработка ткани. Кусочки исследуемой опухоли гортани (для определения достаточно 30—50 мг) тщательно отмывают от крови охлажденным 0,9% раствором NaCl, осушают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают ножницами (1—3 мин) и при охлаждении на льду растирают в течение 1—3 мин в ручном стеклянном гомогенизаторе в 8,5% растворе сахарозы (из расчета 10 мг ткани и 0,1 мл раствора сахарозы). Полученный гомогенат разбавляют в 3 раза 8,5% раствором сахарозы и центрифугируют в рефрижераторной центрифуге в течение 10 мин при 10 000 g. Осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость повторно центрифугируют при том же режиме и используют для определения активности ЛДГ (в день взятия материала).

Реактивы используются те же, что и для определения активности ЛДГ в сыворотке крови. При постановке реакции в пробирке смешивают 2,7 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4, 0,1 мл

раствора НАДН·Н+ и 0,1 мл надосадочной жидкости. В. кювету от спектрофотометра наливают 0,1 мл раствора пировиноградно-кислого натрия. Пробирку и кювету преинкубируют в водяном термостате в течение 5 мин при 37° С. Затем в кювету выливают содержимое пробирки и немедленно измеряют в спектрофотометре оптическую плотность смеси при длине волны 340 нм против кюветы с дистиллированной водой. Затем кювету снова помещают в водяной термостат и через каждые 2 мин в течение 6 мин измеряют оптическую плотность пробы. Снижение поглощения (ΔE_{340}) за каждый отрезок времени должно составлять 0,040—0,080. При большей активности фермента надосадочную жидкость разводят 8,5% раствором сахарозы так, чтобы ΔE_{340} соответствовало указанным величинам. Ферментативную активность выражали в мкмоль/ (мин·мг белка). Количество белка определяли методом Lowry и соавторов (1951).

Расчет активности ЛДГ проводили по формуле:

$$\text{активность ЛДГ} = \frac{А \cdot 0{,}483}{Б},$$

где А — снижение оптической плотности за 1 мин;

0,483 — коэффициент пересчета оптической плотности в мкмоль;

Б — количество белка в пробе в мг.

Пример расчета. Снижение оптической плотности за 1 мин составляет 0,030. Количество белка в пробе — 0,020 мг. Удельная активность (УА) ЛДГ, рассчитанная по формуле, равна:

$$УА = \frac{0{,}030 \cdot 0{,}483}{0{,}020}\ 0{,}72\ \text{мкмоль/ (мин} \cdot \text{мг белка).}$$

Определение активности протеолитических ферментов в опухолевой ткани по расщеплению субстрата гемоглобина

Гомогенат ткани готовится, как описано выше (с. 168). Только для проведения этих исследований требуется большее количество материала (200—300 мг ткани) и растирание его проводится в фарфоровой ступке, а не в ручном стеклянном гомогенизаторе.

Метод определения активности протеиназ по расщеплению субстрата гемоглобина описан выше (с. 153—154). Для данного случая опытная смесь состояла из 2 мл 5% раствора бычьего гемоглобина, 0,5 мл раствора 1,35 М уксусной кислоты и 0,5 мл гомогената ткани. Время инкубации 1—2 ч. Удельная протеолитическая активность выражалась в мкмоль тирозина/(ч·мг белка).

РЕЦЕПТУРНЫЕ ПРОПИСИ ПРЕПАРАТОВ ФЕРМЕНТОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ

1. Rp.: Trypsini crystallisati 0,01
Lysozim 0,05
Urea 0,5
Morphocyclini 0,075
Glycerini —
Aq. distill. aa 2,5
M. D. S. Для введения в гайморову полость по 1 мл

2. Rp.: Alfa-chymotrypsini crystallisati 0,03
Laevomycetini 0,45
Glycerini 7,5
Ol. Vaselini 5,0
Lanolini 2,5
M. f. emuls.
D. S. Вводить в полость среднего уха

3. Rp.: Trypsini crystallisati 0,03
Laevomycetini 0,45
Hydrocortisoni 0,03
Glycerini 7,5
Ol. Vaselini 5,0
Lanolini 2,5
M. f. emuls.
D. S. Вводить в полость среднего уха

4. Rp.: Trypsini crystallisati 0,01
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое 1 флакона растворить в 2 мл 0,5% раствора новокаина и вводить внутримышечно по 1 мл 2 раза в день

5. Rp.: Alfa-chymotrypsini crystallisati 0,01
D.t.d. № 20 in flac.
S. Содержимое 1 флакона растворить в 2 мл стерильного физиологического раствора и вводить внутримышечно 1—2 раза в день

6. Rp.: Chymopsini 0,05
D. t. d. № 20 in flac.
S. Содержимое 1 флакона растворить в 20 мл физиологического раствора, смочить стерильный тампон или салфетку и ввести в рану (или присыпать раневую поверхность сухим порошком)

7. Rp.: Trypsini 0,01
D. t. d. № 10 in flac.

S. Растворить содержнмое 1 флакона в 5 мл фнзиологического раствора и закапывать в трахеостому по 8—10 капель каждые полчаса

8. Rp.: Desoxyribonucleasi 0,01
D. t. d. № 10 in flac.
S. Для ингаляцнй. Развестн в 5 мл физнологического раствора

9. Rp.: Ribonucleasi 0,025
D. t. d. № 10 in flac.
S. Для присыпки

10. Rp.: Trypsini 0,01
Urea 0,1
M. f. pulv. D. t. d. № 30
S. Прнсыпка для раны

11. Rp.: Sol. Acidi aminocapronici 5%—100
D. t. d. № 10 in ampull.
S. Для внутривенных вливаний (вводнть медленно)

12. Rp.: Sol. Acidi aminocapronici 5%—500,0
S. Внутрь по 1—2 столовые ложкн каждые 4 часа

13. Rp.: Fibrinogeni 2,0
Trasyloli 25 000 KIE
Растворить в 500 мл 0,9% раствора нагрия хлорнда изотонического для инъекций
S. Для введения в вену (капельно)

14. Rp.: Trypsini crystallisati 0,01
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое флакона непосредственно перед введеннем растворить в 20 мл уннверсального ацетатно-вероналового буфера. pH 7,0, прибавить 1 мл 10% раствора $CaCl_2$. Вводнть методом электрофореза

15. Rp.: Chymotrypsini crystallisati 0,01
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое флакона растворить в 20 мл универсального ацетатно-вероналового буфера, pH 7,0, добавить 1 мл 10% раствора $CaCl_2$. Вводить методом электрофореза

16. Rp.: Chymopsini 0,05
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержнмое флакона растворить в 25 мл уннверсального ацетатно-вероналового буфера, pH 7, 0, н добавить 1,25 мл 10% раствора $CaCl_2$. Вводнть методом электрофореза

17. Rp.: Trasyloli 25 000 KIE
D. t. d. № 10 in ampull.
S. Содержимое каждой ампулы растворить в 20—30 мл физиологического раствора. Вводить методом электрофореза

18. Rp.: Contrycali 10 000 АТрЕ
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое флакона растворить в 20—30 мл физиологического раствора. Вводить методом электрофореза

19. Rp.: Ribonucleasi 0,025
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое одного флакона растворить в 25 мл ацетатно-вероналового буферного раствора, pH 6,0. Вводить методом электрофореза

20. Rp.: Lidasi 0,1
D. t. d. № 10 in flac.
S. Содержимое флакона растворить в 20 мл ацетатно-вероналового буферного раствора, pH 7,7. Вводить методом электрофореза

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Автандилов Г. Г., Круглова И. С., Автандилова Л. И. Гистоэнзиматическая характеристика рака гортани человека.— «Вопр. онкол.», 1972, т. 18, № 3, с. 28—31.

Адо А. Д. Частная аллергология. М., «Медицина», 1976. 512 с.

Андреенко Г. В. Фибринолиз. Биохимия, физиология, патология. М., издательство МГУ, 1979, 351 с.

Андрейченко В. И., Калиновская Л. П. Гистохимия ключевых окислительно-восстановительных ферментов в миндалинах и других лимфоидных образованиях кроликов при экспериментальной аллергии.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1974, № 4, с. 26—30.

Аникин И. А., Фролов Б. А. Содержание лизоцима в сыворотке крови, слюне и ткани нёбных миндалин у больных хроническим тонзиллитом.— В кн.: Неспецифический иммунитет. Оренбург, 1973, с. 14—16.

Антонова Н. А. Сравнительное изучение окислительно-восстановительных ферментов в миндалинах больных хроническим тонзиллитом и хроническим тонзиллитом, сопряженным с коллагеновыми заболеваниями.— В кн.: Вопросы патологии верхних дыхательных путей. М., 1973, с. 98—100.

Бабаян Г. А., Вартазарян Н. Д. Возрастные особенности гиалуронидазной активности и морфогистохимических показателей ткани нёбных миндалин при хроническом токсико-аллергическом тонзиллите.— «Вестн. оторинолар.», 1970, № 5, с. 75—81.

Беликов П. П. Об антикоагулянтной активности слюны.— «Лабор. дело», 1971, № 6, с. 344—346.

Белицер В. А., Веремеенко К. Н. О взаимодействиях трипсина с сывороточным ингибитором I и субстратами.— «Биохимия», 1964, в. 1, с. 126—131.

Березов Т. Т. Проблема энзимотерапии опухолей.— «Вест. АМН СССР», 1971, № 11, с. 35—46.

Блохин Н. Н. Современное состояние химиотерапии злокачественных опухолей.— В кн.: Химиотерапия злокачественных опухолей. М., «Медицина», 1977, с. 3—9.

Богомолова Л. Г., Куралева В. В., Розанова Л. М. и др. Лечение больных острым лейкозом ферментом рибонуклеазой.— «Тр. Ленинград. химико-фарм. ин-та», в. 20, «Ферменты в эксперим. и клинич. онкол. и радиол.», ч. II, Л., 1967, с. 74—78.

Богуш Л. К., Шварцман Л. Я. Применение протеолитических ферментов при туберкулезе легких. М., «Медицина», 1970. 128 с.

Браунштейн А. Е. Заключительное слово.— В кн.: Проблемы медицинской энзимологии. М., «Медицина», 1970, с. 341—348.

Бровко Т. Е., Кизим А. И. Активность фибриназы и антифибринолитическая активность крови у больных раком гортани.— «Ж уши., нос., горл. бол.», 1971, № 1, с. 12—16.

Буракова З. Н., Берестецкая Л. А. Опыт лечения экссудативных средних отитов.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1975, № 1, с. 91—93.

Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лнзоцнм и его роль в биологии и меднцнне. Томск, 1974. 208 с.

Быкова В. П. Об активиости моиоамииооксидазы в слизистой оболочке иоса больных хроиническнми риносннунтами.— «Вести. оториолар.», 1971, № 3, с. 83—87.

Веремеенко К. Н. Применение протеолитическнх ферментов в меднцние.— «Врач. дело», 1959, № 12, с. 1269—1276.

Веремеенко К. Н. К механизму протнвоотечиого действня пареитеральио вводимых кристаллических протеиназ.— «Вопр. мед. химин», 1962, в. 8, с. 525—531.

Веремеенко К. Н. Протеолитическне ферменты поджелудочиой железы и их применеиие в клинике. Киев, «Здоров'я», 1967. 160 с.

Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза н их ннгнбиторы в медициискої практике. Киев, «Здоров'я», 1971. 216 с.

Веремеенко К. Н. Биохимические обоснования исследоваиня ферментов и их иигибиторов в физиотерапии ЛОРорганов.— «Ж. ушн., иос., горл. бол.», 1977, № 5, с. 63—70.

Веремеенко К. Н. Кинииовая система. Кнев, «Здоров'я», 1977. 184 с.

Веремієнко К. М., Циперович О. С. Одержання кристалічиого трипсниу для пареитеральиого введения та внвчення деяких його властивостей.— «Укр. біохім. ж.», 1961, № 1, с. 32—36.

(Веремеенко К. Н., Белицер В. А.) Weremeenko K. N.. Belitzer W. A. Protaminspaltung durch Trypsin in Gegenwart eines Serum-Inhibitors und Bestimmung des Trypsins im Blut bei parenteraler Applikation. — «Acta Biol. Med. Germ.», 1963, Bd. 11, s. 451—462

Веремеенко К. Н., Французов Б. Л. О примеиеиии протеолитнческнх ферментов в отолариигологии.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1963, № 1, с. 80—83.

Веремеенко К. Н., Опанащенко Г. А. Примеиеиие протеиназ и иуклеаз в комплексиом лечеиии послеоперациоиных ран и лучевых осложиеиий у больных раком гортаин.— «Ж. ушн., иос., горл. бол.», 1968, № 4, с. 44—50.

Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И. Исследоваиие изоферментов щелочной фосфатазы сыворотки крови у больных отосклерозом.— «Вести. оториполар.», 1972, № 5, с. 3—7.

Веремієнко К. М., Хоменко Л. О. Визначеиия протеолітнчиої активиості слииpermalink.— «Укр. біохім. ж.», 1973, т. 45, № 2, с. 223—226.

Веремеенко К. Н., Кизим А. И. Ингибиторы протеолитических ферментов и их исследоваиие в клииике.— «Вопр. мед. химии», 1975, т. 26, в. 1, с. 5—13.

Веремеенко К. Н., Бровко Т. Е., Бегунова Т. И. Применение протеолитических ферментов при лечеиии хроиических гиойных средиих отитов.— «Вести. оториолар.», 1969, № 2, с. 78—79.

Веремеенко К. Н., Герасименко Н. Г., Погорелова Л. М. Клииико-биохнмические обосиования применеиия ингибиторов фибриполиза в терапии кровотечеиий при ЛОРзаболеваинях.— «Ж. уши., иос., горл. бол.», 1972, № 3, с. 56—61.

Веремеенко К. Н,. Кизим А. И., Тимен Г. Э. Сывороточные иигибиторы фибрииолиза и протеолиза у больных хроиическим тоизиллитом.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1972, № 1, с. 65—70.

Веремеенко К. Н., Лосицкая В. М., Бегунова Т. И. Исследование кииинобразующих н кинииращепляющих ферментов кровн у больных аллергнческими ринитами.— «Ж. уши., иос., горл. бол.», 1974, № 6, с. 36—41.

Веремеенко К. Н., Лосицкая В. М., Зражва Э. Л. Исследование ферментов н субстратов калликренн-книнновой снстемы в кровн больных хроннческим тоизиллитом до и после тоизнллэктомии.— «Вести. оториолар.», 1974, № 6, с. 45—49.

Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Грома С. П. Исследование ферментативных систем протеолиза в слюне больных хроническим тонзиллитом.— «Вести. оторинолар.», 1975, № 6, с. 13—15.
Веремеенко К. Н., Хоменко Л. А., Кизим А. И. Ферменты слюны и их исследование в клинике.— «Лабор. дело», 1976, № 7, с. 393—399.
Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Грома С. П. Изучение ферментов кининовой системы в слюне больных хроническим тонзиллитом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1977, № 3, с. 19—22.
Веремеенко К. Н., Цыганов А. И., Лосицкая В. М., Опанащенко Г. А. Исследование гексокиназной активности сыворотки крови у больных со злокачественными опухолями ЛОРорганов.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1972, № 6, с. 72—76.
Веремеенко К. Н., Бегунова Т. И., Лосицкая В. М., Мартынюк Л. А. Применение ингибиторов протеиназ в комплексной терапии поллинозов.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1978, № 3, с. 12—16.
Веремеенко К. Н., Федотов А. Ф. Лосицкая В. М. и др. Биохимическое и гистохимическое изучение нуклеиновых кислот и деполимеризующих их ферментов в раковой опухоли гортани до и после воздействия рибонуклеазы.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1970, № 3, с. 21—29.
Веремеенко К. Н,. Карпенко Г. Ф. Иммобилизованные ферменты и перспективы их применения в оториноларингологии.— «Журн. ушн., нос, горл. бол.», 1979, № 6, с. 72—76.
Верник С. Д. Лечение воспалительных заболеваний методом электрофореза трипсином.— «Хирургия», 1971, № 11, с. 49—51.
Вершигора А. Е., Веремеенко К. Н., Визиренко Л. В. и др. Иммунология нёбных миндалин. Киев, «Вища школа», 1978, 146 с.
Волохонская Л. И., Гукович В. А. Функциональное состояние коры надпочечников и минеральный обмен у больных отосклерозом при различной активности процесса.— В кн.: Современные проблемы оториноларингологии. Киев, «Здоров'я», 1970, с. 55—66.
Волохонская Л. И., Веремеенко К. Н. Исследование сывороточных ингибиторов фибринолиза и протеолиза у больных отосклерозом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1971, № 1, с. 28—32.
Волохонская Л. И., Веремеенко К. Н., Грома С. П. Протеолитические ферменты в лимфоцитах нёбных миндалин у больных хроническим тонзиллитом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1976, № 3, с. 41—46.
Гаджиев М. К. Особенности течения послеоперационного периода при тонзиллэктомии с местным применением эпсилон-аминокапроновой кислоты.— «Вест. оторинолар.», 1976, № 2. с. 57—59.
Герасименко Н. Г., Щуровский В. В. Применение эпсилон-аминокапроновой кислоты с целью профилактики кровотечений при слухоулучшающих операциях у больных отосклерозом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1971, № 5, с. 101—102.
Гербер В. Х., Тимошевский В. И. Применение эпсилон-аминокапроновой кислоты у больных вазомоторным ринитом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1974, № 1, с 84—87.
Гефен Н. Г. Протеолитическая активность ткани миндалин при хроническом тонзиллите.— В кн.: Сборник трудов Ленинградского НИИ болезней уха, горла, носа и речи. Л., 1966, т. 14, с. 278—281.
Голобородько О. П., Опанащенко Г. А. Активность лактатдегидрогеназы в тканях доброкачественных и злокачественных новообразований гортани.— «Вестн. оторинолар.», 1977, № 2, с. 26—29.
Голобородько О. П., Опанащенко Г. А., Лосицкая В. М. Исследование активности протеолитических ферментов в ткани злокачественных новообразований гортани.—«Вопр. онкол.», 1979, № 11, с. 73—74.

Гостищев В. К., Ханин А. Г., Муляев Л. Ф. и др. Влияние протеолитических ферментов на регенерацию гнойных ран в клинике по материалам цитологических и цитохимических исследований.— «Вестн. АМН СССР», 1973, № 3, с. 70—74.

Грановская Е. М. Активность некоторых ферментов у больных раком гортани на различных этапах анестезиологического пособия. Автореф. дис. канд. Днепропетровск, 1972. 19 с.

Грома С. П. Эффективность и обоснование применения препаратов крови и ингибиторов фибринолиза в профилактике кровотечений после тонзиллэктомии. Автореф. дис. канд. Киев, 1971, 23 с.

Гукович В. А. О показаниях к повторным пластическим операциям на овальном окне у больных отосклерозом.— «Вестн. оториноларг.», 1972, № 2, с. 41—45.

Гущин И. С. Немедленная аллергия клетки. М., «Медицина», 1976. 176 с.

Данилевский Н. Ф., Хоменко Л. А. Применение ферментов в стоматологии. Киев, «Здоров'я», 1972. 188 с.

Данилов И. П. Значение гиалуронидазы и гиалуроновой кислоты в сыворотке крови при хроническом тонзиллите.— «Здравоохранение Белоруссии», 1962, № 1, с. 33—35.

Данющенкова Н. М., Кардович Г. А., Беренштейн Г. Ф. Действие линкомицина, химотрипсина и их сочетаний на течение экспериментальной стафилококковой инфекции.— «Антибиотики», 1978, № 4, с. 330—333.

Евдощенко Е. А., Лекарева Н. Я. Тефлоновый дренаж в комплексном лечении острого и хронического гайморита у детей.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1976, № 4, с. 7—12.

Евдощенко Е. А., Мельник М. А. Щадящее консервативно-хирургическое лечение отоантритов.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1976, № 5, с. 49—54.

Егорова Л. В., Родионова Т. Н. Сравнительная оценка различных методов введения химотрипсина при спаечных процессах среднего уха у детей.— «Вестн. оториноларг.», 1973, № 2, с. 38—41.

Жданов В. С. Материалы к изучению обменных процессов при хроническом тонзиллите. Автореф. дис. докт. М., 1971. 31 с.

Зарицкий Л. А., Авраменко Л. В., Терентьев Г. В. Протеолитические ферменты при лечении некоторых оториноларингологических заболеваний.— В кн.: Ферменты в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Киев «Наукова думка», 1968, с. 180—182.

Затикян Л. О. Σ-аминокапроновая кислота как антиаллергическое средство в хирургической практике.— «Клин. мед.», 1975, № 11, с. 103—105.

Збарский И. Б., Адигамов Л. Ф. Нуклеазы слюны и слюнных желез в норме и при патологии.— «Вестн. АМН СССР», 1971, № 11, с. 3—12.

Зражва Э. Л. Некоторые биохимические показатели крови у больных с новообразованиями гортани.— В кн.: Оториноларингология, вып. 2. Киев, «Здоров'я», 1971, с. 65—70.

Зубаиров Д. М. Биохимия свертывания крови. М., «Медицина», 1978. 176 с.

Иванов И. И., Коровин Б. Ф., Маркелов И. М. Введение в клиническую энзимологию. Л., «Медицина», 1974. 277 с.

Кавецкий Р. Е. Взаимодействие организма и опухоли. Киев, «Наукова думка», 1977. 234 с.

Казарьянц Р. А. Цитохимическое изучение активности щелочной фосфатазы в лейкоцитах крови у больных раком и доброкачественными опухолями гортани.— «Тр. Ленингр. НИИ по болезням уха, горла, носа и речи» «Вопр. физиол. и патол. органа слуха и верхних дыхательных путей», Л., т. XV, 1968, с. 246—250.

Карал-Оглы Р. Д. Щадящее лечение гнойных гайморитов.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1973, № 2, с. 81—82.
Карась А. Ф. Влияние лучевой терапии на гистохимию НАД-H_2-, НАДФ.H_2-дегидрогеназ и лактатдегидрогеназы в раковых опухолях гортани человека.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1974, № 3, с. 13—18.
Кашеварова З. И. Гиалуроновая кислота, гиалуронидаза-антигиалуронидаза, гепарин крови у больных хроническим тонзиллитом.— В кн.: Сердечнососудистая патология. Харьков, 1973, в. 110, с. 83—85.
Кизим А. И., Мельников О. Ф. Исследование ферментных систем протеолиза в миндалинах и других лимфоидных образованиях в норме и при экспериментальном тонзиллите.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1974, № 6, с. 66—70.
Кицманюк З. Д., Бахарева Г. И. Содержание рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот в опухолевой ткани гортани в зависимости от характера роста опухоли.— «Вестн. оториолар.», 1971, № 1, с. 46—49.
Коломийченко А. И., Веремеенко К. Н. Итоги экспериментального изучения и клинического применения протеолитических ферментов.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1965, № 3, с. 3—12.
Коломийченко А. И., Гукович В. А., Харшак Е. М., Яшан И. А. Операции на стремени при отосклерозе. Киев, «Здоров'я», 1963. 281 с.
Королев М. Ф., Заец И. А. Некоторые вопросы теории аллергии и лечения больных с аллергическими заболеваниями ЛОРорганов.— «Воен.-мед. ж.», 1972, № 10, с. 37—41.
Костюнина Л. В., Скипетров В. Б. Факторы свертывания крови нёбных миндалин и механизм изменений гемокоагуляции при тонзиллэктомии.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1978, № 1, с. 74—79.
Кузник Б. И., Беликов П. П,. Пинелис Т. Б., Пинелис И. С. Свертывающая и фибринолитическая активность слюны и ее роль в физиологии и патологии полости рта.— «Стоматология», 1976, № 4, с. 90—94.
Курилин И. А., Веремеенко К. Н., Черный В. С., Аврамия О. А. Протеолитические ферменты в комплексной терапии ларинготрахеобронхитов у детей раннего возраста.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1975, № 5, с. 43—49.
Куриненко Б. М., Беляева М. И., Черепнева И. Е., Виестуре З. А. Противоопухолевое действие нуклеазы Ser ma cescens, ковалентно связанной с растворимыми декстранами.— «Вопр. онкол.», 1977, № 11, с. 94—98.
Лихачев А. Г. Опыт применения ферментных препаратов из животного сырья (трипсина и химотрипсина) в оториноларингологии.— «Вестн. оториолар.», 1965, № 1, с. 8—19.
Лосицкая В. М. Изучение протеолитической активности в клеточных структурах опухолевой ткани больных раком гортани.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1973, № 3, с. 19—23.
Лосицкая В. М., Бегунова Т. И. Изучение некоторых показателей кининовой системы в носовом секрете у больных аллергическими ринитами.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1975, № 4, с. 57—63.
Лосицкая В. М., Бегунова Т. И. Разработка биохимических обоснований применения ингибиторов кининовой системы в комплексной терапии аллергических риносинусопатий.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1977, № 4, с. 20—24.
Луценко М. А., Лосицкая В. М. Исследование антипротеолитической активности и протеиназ в раковой опухоли гортани с учетом морфологических особенностей ее строения.— В кн.: Современные проблемы оториноларингологии. Киев, «Здоров'я», вып. I, 1970, с. 337—342.
Манойлов С. Е. Биохимические основы злокачественного роста. Л., «Медицина», 1971. 228 с.
Манойлов С. Е., Орлова В. И., Полосова Р. Г. Влияние РНК-азы на рост опухоли.— «Вопр. онкол.», 1966, т. 12, № 1, с. 64—69.

Мардашев С. Р. Биохимические проблемы медицины. М., «Медицина», 1975. 288 с.

Маркзицер А. Л. Применение фермента уреазы и мочевины при некоторых воспалительных заболеваниях ЛОРорганов.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1974, № 6, с. 87—88.

Маркова К. П., Михайлов В. В. Гексокиназный тест при злокачественных опухолях верхних дыхательных путей и уха.— В кн.: Науч. тр. Ленинград. инст. усовершенств врачей. Л., 1971, вып. 94, с. 220—222.

Меньшиков Н. А. К вопросу применения лидазы и дезоксирибонуклеазы при некоторых заболеваниях среднего уха.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1968, № 2, с. 77—79.

Митрофанова Е. И. Кислая и щелочная фосфатазы в сыворотке крови у больных раком ЛОРорганов.— «Вестн. оторинолар.», 1965, № 2, с. 82—87.

Московченко Н. А. Некоторые данные о функциональном состоянии защитно-адаптационных систем и неспецифической реактивности у больных различными формами хронического тонзиллита. Автореф. дис. докт. Донецк, 1975. 26 с.

Мосолов В. В. Протеолитические ферменты. М., «Наука», 1971. 414 с.

Небожина Е. М. Активность трансаминаз крови во время операции и в послеоперационном периоде у больных раком гортани.— Матер. итог. научно-практ. конф. Днепропетровск, 1968, с. 191—193.

Нейфах С. А., Монахов Н. К. Теоретические предпосылки и методика исследования гексокиназы с целью диагностики злокачественных новообразований.— «Вопр. онкол.», 1967, т. 13, № 12, с. 3—9.

Овсесян Р. С., Мкртчян Р. Г. О механизмах сдвигов в протеолитических процессах при злокачественном росте.— «Биол. ж. Армении», 1977, т. 30, № 3, с. 95—96.

Олейник И. И. Влияние ферментов на злокачественные опухоли.— «Вопр. онкол.», 1966, т. 12, № 11, с. 104—109.

Опанащенко Г. А., Лосицкая В. М., Карась Г. А. Ферменты нуклеазного и протеолитического действия в комплексной терапии больных раком верхних дыхательных путей.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1975, № 5, с. 56—62.

Опанащенко Г. А., Розенфельд Л. Г. Энзимотерапия состояний нового пищепроводного пути у ларингэктомированных больных.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1978, № 1, с. 33—39.

Панавене Д. П., Банжюлене С. Ю., Лятукене А. В. Изучение некоторых биохимических свойств лимфоцитов, полученных из нёбных миндалин больных хроническим тонзиллитом и ревматизмом.— Матер. IV респ. конф. оторинолар. Литовской ССР. Вильнюс, 1973, с. 80—83.

Пигулевский Д. А. Некоторые актуальные вопросы биохимической оториноларингологии.— «Вестн. оторинолар.», 1968, № 5, с. 3—8.

Покровский А. А. Некоторые аспекты применения ферментов в медицине.— «Ж. Всес. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева», 1965, № 10, с. 648—658.

Преображенский Н. А. Актуальные вопросы тонзиллярной патологии.— Тр. IV съезда оторинолар. УССР. Киев, «Здоров'я», 1972, с. 52—56.

Преображенский Б. С., Попова Г. Н. Ангина, хронический тонзиллит и сопряженные с ними общие заболевания. М., 1970. 384 с.

Ровенский Ю. А. Биохимическая роль нуклеаз в нормальном и опухолевом росте.— «Успехи совр. биол.», 1965, т. 59, № 3, с. 354—373.

Рыбина О. Ф. Тканевые факторы свертывания крови в нёбных миндалинах человека.— «Вестн. оторинолар.», 1973, № 2, с. 61—63.

Рындина А. М. Методические рекомендации по применению Σ-аминокапроновой кислоты в качестве десенсибилизирующего средства в оториноларингологии. Л., 1975. 9 с.

Сенченко Л. С. Гистохимия липидов в раковых опухолях гортани, не подвергавшихся консервативному лечению.— «Ж. ушн., нос. горл. бол.», 1974, № 3, с. 18—23.

Сквирская А. А., Эркес Е. Л., Грановская Е. М., Белаковская С. М. Значение исследования трансаминаз и некоторых гликолитических ферментов у больных раком гортани во время анестезиологического пособия.— В кн.: Ферменты в лабораторной диагностике. Материалы I Всесоюзного съезда врачей-лаборантов. Харьков, М., 1973, т. 2, с. 27—29.

Сквирская А. А., Эркес Е. Л., Грановская Е. М., Белаковская С. М. Лактатдегидрогеназа и ее изоферменты в сыворотке крови и эритроцитах больных раком гортани.— «Вестн. оториноларинг.», 1977, № 4, с. 88.

Солдатов И. Б. Современные аспекты генеза хронического тонзиллита.— Тр. IV съезда оториноларингологов УССР. Киев, «Здоров'я», 1972, с. 55—62.

Солдатов И. Б. Диагностика и лечение экссудативного среднего отита.— Материалы V респ. конф. оториноларингологов Литовской ССР. Вильнюс, 1978, с. 49—50.

Сосин И. Н. Лекарственные растворы, применяемые для лечебного электрофореза. Методические рекомендации. Днепропетровск, 1973.

Старков Г. Л., Савиных В. И. Ферментотерапия в офтальмологии. Кемерово. Кемеровское книжное изд-во, 1977. 126 с.

Стручков В. И., Григорян А. В., Гостищев В. К. и др. Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. М., «Медицина», 1979. 408 с.

Суровикина М. С., Палеев Н. Р., Гаврилова Р. Д. Кинины плазмы крови и их значение в патологии органов дыхания.— «Сов. мед.», 1972, № 12, с. 59—66.

Тамм Л. Я., Брязгунов И. П. О состоянии ферментных систем у детей при хроническом тонзиллите токсико-аллергической формы без сопряженных заболеваний — «Вестн. оториноларинг.», 1969, № 5, с. 101—105.

Толстых П. И., Афанасов И. И., Цыб А. Ф., Куликов В. А. Лечение и профилактика аллергических реакций ингибиторами фибринолиза и протеаз.— «Сов. мед.», 1974, № 12, с. 105—109.

Улащик В. С. Теория и практика лекарственного электрофореза. Минск, «Беларусь», 1976. 208 с.

Филатов В. Ф. Применение эпсилон-аминокапроновой кислоты для лечения аллергических ринопатий.— Матер. II научн. конф. рационализаторов и изобретателей ХМИ по разработке и внедрению новых методов диагност. и леч. Харьков, 1970, с. 129—130.

Халфен Л. Н. О патогенезе кровотечений при тонзиллэктомиях и применение Σ-аминокапроновой кислоты с целью их предупреждения.— «Вестн. оториноларинг.», 1967, № 3, с. 76—79.

Цыганов А. И., Голобородько О. П., Опанащенко Г. А. Активность лактатдегидрогеназы в клеточных фракциях опухолевой ткани и сыворотке крови при раке гортани.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1978, № 2, с. 52—56.

Черный В. С. Протеолитические ферменты в комплексном лечении острых стенозирующих ларинготрахеобронхитов у детей раннего возраста. Автореф. дис. канд. Киев, 1974. 15 с.

Шаихов З. С., Жусупов Б. З. Содержание лизоцима в сыворотке крови больных хроническим тонзиллитом.— «Здравоохранение Казахстана», 1977, № 9, с. 82—83.

Шаихов З. Ш., Усенко М. М., Селескерова А. Ф. Применение лизоцима для лечения больных гнойным средним отитом.— «Ж. ушн., нос., горл. бол.», 1979, № 2, с. 33—36.

Шапот В. С. Нуклеазы. М., «Медицина», 1968. 212 с.

Шапот В. С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М., «Медицина», 1975. 230 с.

Шевцов В. М., Елхов В. А. Кровенаполнение нёбных миндалин при применении эпсилон-аминокапроновой кислоты.— «Ж. уши., нос., горл. бол.», 1976, № 6, с. 38—41.

Шевченко А. М., Меркулова С. В. Динамика коагулирующих свойств крови у больных раком гортани при хирургическом лечении.— «Вести. оториноларо», 1975, № 4, с. 96—99.

Шукурян К. Г. Значение нарушения сосудистой и тканевой проницаемости в механизме развития хронического тонзиллита и сопряженных с ним заболеваний. — „Тр. VI съезда оториноларингологов СССР". М., 1970, т. 1, с. 213 — 216.

Abramson M., Schilling R. W., Cheng-Chun Huang, Salome R. G. Collagenase activity in epidermoid carcinoma of the oral cavity and larynx. —„Ann. Otol., Rhinol., Laryngol.", 1975, v. 84, № 2, p. 158—163.

Bednarski W., Kubik K., Mikulewicz W. Fibrinolytic properties of the nasal mucous membrane secretion. — „Acta Oto-Laryng", 1970, v. 70, № 3, p. 212—215.

Berova N., Petkov J., Andreev U. C. Treatment of chronic urtricaria with a proteinase (kallikrein) inhibitor. — „Brit. J. Derm.", 1974, v. 90, p. 431 — 434.

Causse J., Chevance L. G., Bel J. L'otospongiose maladie enzymatiques cellulaire et lysosomale confrontation cytoclinique. — „Ann. Otolaryng.", 1972, v. 89, p. 563 — 595.

Gausse J. et al. Enzymatic concept of otospongiosis and cochlear otospongiosis. — „Clin. otolaryngol., 1977, v. 2, № 1, p. 23 — 32.

Cheng-Chun H., Abramson M., Schilling R. W., Salome R. G. Collagenase activity in tumors of the head and neck. — „Trans. Amer. Acad. Opthal. Otolaryng.", 1976, v. 82, № 2, p. 138—141.

Chevance L. G., Causse J. R., Berges J. α_1-Antitrypsin activity of perilimph. — „Arch. Otolaryng.", 1976, v. 102, № 6, p. 363 — 364.

Chevance L. G., Causse J., Berges J. et al. Use explication biochemique et cytologique de l'otospongiose cochleaire. — „Ann. Otolaryng.", 1976, v. 93, № 4 — 5, p. 275 — 285.

Chyrek-Borowska S., Hofman J., Matusiewicz R. Ensymy protealityczne i ich inhibitory w przewlektych nieswoistych chorobach ukladu oddechowego. — „Pol. Tyg. lek.", 1973, t. 28, № 24, s. 916 — 918.

Данев С. Состояние и развитие ферментативной диагностики (обзор литературы). — „Лабор. дело", 1973, № 4, с. 199 — 207.

De Weck A. L. Chemical mediators of allergic reactions. — „Folia allergol. immunol. clin.", 1975, № 22, p. 505 — 513.

Ellegaard J., Traemberg H., Dorff B., Esmann V. Increased lymphocyte ATP-ase activity in patients with carcinomas of the oral cavity and larynx. — „Acta Oto-Laryngol." 1975, v. 80, № 5 — 6, p. 459 — 464.

Farbiszewski R., Worowski K. Enzymy proteolytyczne tkanek nowotworowych. — „Post. Biochem." 1975, v. 21, № 4, p. 407 — 423.

Frey E. K., Kraut H., Werle E. Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Stuttgart, 1968, 290 p.

Fujisaki S., Sakai Ishida M. Studies of LDH activity concerning malignant transformation from chronic sinusitis. — „Asta otolaryng.", 1972, v. 73, № 1, p. 61 — 63.

Grundmann G., Michalski H. Zur Bestimmung der aldolase beim Larynxkarzinom. — „Dt. Gesundh.-Wesen.", 1977, Bd. 32, № 18, s. 849 — 850.

Hochstrasser K., Haendle H., Reichert R., Werle E., Schwarz S. Über Vorkommen und Eigenschaften eines proteasen inhibitors in menschlichen Nasensekret. — „Hoppe — Sey. Z. Physiol. Chem." 1971, Bd. 352, № 7, s. 954 — 958.

Hochstrasser K., Reichert R., Matzner M., Werle E. Hemmbarkeit proteolytischen enzyme in patologischen Nasensekreten und von Leukocytenproteasen durch den natürlichen proteaseninhibitor des Nasensekret. — „Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.", 1972,Bd. 10, № 2, s. 104 — 107.

Holdsworth C. E., Endahl G. L., Soifer N., Richardson K. E., Eyring E. J. Comparative biochemical study of otosclerosis a osteogenesis imperfecta. — „Arch. Otolaryng.", 1973, v. 98, № 5, p. 336 — 339.

Ishii T. Histochemical study on malignant granuloma (Japanese). — „Otol. Fukuoka," 1972, v. 18, № 3, p. 185 — 189.

Lukjan H., Hofman J., Kiersnowska B., Bielawiec M., Chyrek-Borowska S. The kinin system in allergic states. — „Allergie und Immunologie" 1972, Bd. 18, Hf. 1, p. 25 — 30.

Mali H. P., Lall B. N., Dayal D. et al. Effect of irradiation on Fibrinolytic activity. III. Changesi in blood fibrinolytic activity due to radiotherapy of malignancy of larynx and pharynx. — „Indian J. Radiol.", 1976. v. 30, № 2, p. 107 — 110.

Mantin I. P., Chevance L. G. Genetique au systeme des inhibiteurs proteasvques et otospongiose. Etude statistidue sur 199 eas. — „Ann. otolaryng.", (Paris), 1976, v. 93, № 12, p. 733—736.

Mikulewicz W., Kubik K., Beolnarski W. Studies on proteins of nagal mucous membrane secretion in fibrinolytic aspect. — «Acta Otoearyng"., 1970, q. 70 № 5 — 6, p. 379 — 382.

Мосс Д., Баттерворт П. (Moss D. B., Batterwort P. J. Энзимология и медицина. М., „Медицина", 1978, 288 с.

Niksic M., Balogh M. Uber Gerinnungsstorungen bei Kehlkopf und Rachen malignomen. — „Laryng., Rhinol., Otol. Grenzgeb.", 1976, Bd. 55, № 5, s. 414 — 419.

Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. (Northrop J. H., Kunitz M., Herriott R. M.) Кристаллические ферменты. М., Изд. иностр. литер., 1950, с. 307 —309.

Ogston D. et al. Studies on complex mechanism for the activation of plasminogen by koalin and by chloroform the participation of Hageman factor and additional cofactors. — „J. Clin. Invest.", 1969, v. 48, № 10, p. 1786 — 1801.

Peclersen N. L. Salivary fibrinolytic activity before and aiter surgery estimated on different types of fibrin. — „Int. J. Oral. Surg.", 1976, №5/6, p. 270—275.

Reichert R., Hochstasser K. Veranderungen des Proteaseninhibitors piegels im menschlichen Nasensekret in Varlauf verschiedener Rhinopathien., — „Z. Laryngol., Rhinol., Otol. und Grenzgeb.", 1972, Bd. 51, № 2, s. 73—80.

Richert Naney D., Ryan Robert J. Protease inhibitors block hormonal activation of adenylate cyclase.— „Biochem. Biophys. Res. Communes.", 1977, v. 78, № 2, p. 799—805.

Rostworowska B. Proteasy lizosomowe i ich znaczenie w patologii.—„Post. Hig. Med. Dosw.", 1974, v. 28, № 6, p. 875—900.

Ruta U., Roznieckı J., Szmidt M. Ocena aktywnosci niektorych enzymow lizosomalnych w leukocytach izolowanych z krwi odwodowy u chrorych z przedwczesna rozedma i u osob zdrowych. — „Pneum. Pol.", 1976, t. 44, № 8-9, s. 891—897

Sasaki Junro. Mechanism of histamin release by alpha-chymotrypsin from isolated rat mast cells. — „Jap. J. Pharmacol.", 1975, v. 25, № 3, p. 311—324.

Sasaki J., Kobe J. Studies of a cathepsin like enzyme in human palatine tonsill. — „J. Med. Sci.", 1972, v. 18, № 3, p. 169—178.

Schnebli H. P. Protease and protease inhibitors in neoplasia. Bayer. Symp. V. „Proteinase inhibit.", Berlin. e. a. 1974, p. 615—620.

Siegel G., Ehrig J., May J. Zur Bedentung der Aldolase bestimmung bei der

rezidiv—und metastasensucke von Tumoren im HNO—bereich. — „Dtsch. Gesundheitsw.", 1975, Bd. 30, № 34, s. 1623—1624.
Skoniezny J. Aktywność aldolazy w surowicy krwi chorych na raka krtani.— „Pol. tyg. lek.", 1973, t. 28, № 32, s. 1232—1234.
Sobozyncki A., Miśkowiak B., Label M. Aktywność i lokalizacya dehydrogenazy kwasu bursztynowego w migdalkach podniebiennyck i gardtowych u dzieci.— „Otolaryng. pol.", 1974, t. 28, № 2, s. 161—166.
Щеклик Э. (Szczeklik E.) Клиническая ферментология. Варшава, 1966. Польское гос. мед. изд., 484 с.
Tanaka E., Amino N., Hayashi C. et al. Abnormal serum lactate dehydrogenase isoenzyme in acaga of laryngeal carcinoma and thyrotoxicosis. — „Clin. Chim. Acta", 1976, v. 68. № 3, p. 235—240
Tolos W. P., Richand D. E., Scheel L. D. Histamine induction and release following proteolytic enzyme exposure. — „Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.", 1975. v. 36, № 4, p. 272 — 277.
Werle E., Zickgraf-Rudel. Natural proteinase inhibitors. — „Z. klin. Chem. u. Klin. Biochem.", 1972, Bd. 4, № 10, s. 146.
Вольф М., Рансбергер К. (Wolf M., Ransberger K.) Лечение ферментами. М., „Мир", 1976, 240 с.
Уилкинсон Дж. (Wilkinson J. H.) Изоферменты. М., „Мир", 1968, 220 с.
Wright J. Lysosomal Enzymes in Fluids from Glue Ear. — „Arch. Oto-Rhino-Laryng.", 1974, v. 208, p. 233—240.

СОДЕРЖАНИЕ

Кузьма Никитович Веремеенко
Алексей Иванович Цыганов
Валерия Александровна Гукович
Лидия Ивановна Волохонская
Ольга Петровна Голобородько
Александра Иосифовна Кизим
Валентина Михайловна Лосицкая
Григорий Авдеевич Опанащенко

ФЕРМЕНТЫ В ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ

Под редакцией докт. биол. наук проф. *К. Н. Веремеенко*

Редактор Л. И. Ковтун
Оформление художника В. П. Данильчука
Художественный редактор Н. А. Сердюкова
Технический редактор В. П. Бойко
Корректор Е. В. Савченко

Информ. бланк. № 1530

Сдано в набор 27.04.79. Подписано к печати 24.01.80. БФ 07510. Формат $60\times84^1/_{16}$. Бумага тип. № 1. Гарн. лит. Печ. выс. Усл. печ. л. 10,7. Уч.-изд. л. 11,73. Тираж 5000 экз. Зак. 635. Цена 1 руб.

Издательство «Здоров'я», 252021, г. Киев—21, ул. Кирова, 7, тел. 93-54-36.

Головное предприятие Республиканского производственного объединения «Полиграфкнига» Госкомиздата УССР, 252057, Киев—57, Довженко, 3.

